





**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON  
ARABINO GALACTAN-PROTEINEN AUS GYMNOSPERMEN UND  
INTERAKTIONSTUDIEN MIT HUMANEN GALEKTINEN**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Alexander Baumann**

Kiel, 2020



Erste Gutachterin:	Prof. Dr. Birgit Classen
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Kunze
Tag der mündlichen Prüfung:	14.10.2020
Zum Druck genehmigt:	14.10.2020



*„Denke nicht nur mit deinem Kopf,*

*denke mit deinem Körper.“*

Eckhart Tolle

*Für Caroline und Arvid-Luca*





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Systematik der Gymnospermen.....	1
1.2. Die Pflanzen <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Ephedra distachya</i> ,.....	
<i>Cycas revoluta</i> und <i>Encephalartos longifolius</i> .....	2
1.2.1. <i>Ginkgo biloba</i> L. ....	2
1.2.2. <i>Ephedra distachya</i> L.....	6
1.2.3. <i>Cycas revoluta</i> Thunb. und <i>Encephalartos longifolius</i> (Jacq.) Lehm .....	8
1.3. Die pflanzliche Zellwand.....	9
1.4. Arabinogalactane (AGs) und Arabinogalactan-Proteine (AGPs) .....	10
1.4.1. AGs.....	10
1.4.2. AGPs .....	12
1.4.3. Funktionen.....	12
1.4.4. Detektion und Isolierung.....	13
1.4.5. Biosynthese .....	14
1.4.6. Räumliche Struktur.....	14
1.5. Humane Galektine .....	15
1.5.1. Allgemeines .....	15
1.5.2. Bindung von pflanzlichen Polysacchariden an humane Galektine .....	17
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit .....	18
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1. Verwendete Geräte und Materialien .....	20
2.1.1. Allgemein verwendetes Material .....	20
2.1.2. Allgemein verwendete Chemikalien .....	21
2.1.3. Verwendetes Drogenmaterial .....	21

<b>2.2.</b>	<b>Methoden der Polysaccharidanalytik.....</b>	<b>22</b>
2.2.1.	Isolierung der wässrigen hochmolekularer Polysaccharid-Fractionen (HMF), der Yariv-Fällung (AGP) und eines Arabinans .....	22
2.2.1.1.	Isolierung der wässrigen HMF .....	22
2.2.1.2.	Isolierung weiterer Polysaccharide aus <i>Ginkgo biloba</i> .....	23
2.2.1.3.	Synthese des Yariv-Reagenzes .....	24
2.2.1.4.	Isolierung der Yariv-Fällungen.....	25
2.2.1.5.	Isolierung eines Arabinans aus <i>Ephedra distachya</i> .....	26
2.2.2.	Geldiffusionstest .....	27
2.2.3.	Analytische Strukturaufklärung der HMFs und der AGPs .....	27
2.2.3.1.	Neutralzuckeranalyse mit Acetylierung .....	27
2.2.3.2.	Kolorimetrische Bestimmung von Uronsäuren .....	29
2.2.3.3.	Reduktion der Uronsäuren .....	30
2.2.3.4.	Alkalische-Hydrolyse .....	31
2.2.3.5.	Oxalsäure-Partialhydrolyse .....	31
2.2.3.6.	Milde TFA-Partialhydrolyse .....	32
2.2.3.7.	Perjodatabbau .....	32
2.2.3.8.	Bindungstypanalyse.....	33
2.2.3.9.	Gehaltsbestimmung von Hydroxyprolin in den AGPs .....	36
2.2.4.	Elementaranalyse .....	37
2.2.5.	Größenausschlusschromatographie mit Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS) .....	38
<b>2.3.</b>	<b>Bindung von AGPs an Antikörper und humane Galektine.....</b>	<b>39</b>
2.3.1.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	39
2.3.2.	Zellfreie Expression von Galektin-1 .....	42
2.3.2.1.	Vorbereitung der Plasmid-DNA-Probe .....	42
2.3.2.2.	Schnelltransformation von <i>E. coli</i> .....	43
2.3.2.3.	Vorkultur von <i>E. coli</i> .....	43
2.3.2.4.	Hauptkultur von <i>E. coli</i> Zellen .....	43
2.3.2.5.	Anlegen einer Dauerkultur .....	44
2.3.2.6.	Isolierung der DNA .....	44

2.3.2.7. Konzentrationsbestimmung der DNA .....	44
2.3.2.8. Zellfreie Galektin-1 Proteinsynthese im präparativen Maßstab.....	44
2.3.2.9. Proteinreinigung über Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose-Affinitätschromatographie .....	47
2.3.2.10.SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	47
2.3.2.11.Coomassie-Färbung .....	49
2.3.2.12.Reinigung des Proteins .....	49
2.3.2.13.Proteinquantifizierung mittels Bradford-Reagenz .....	49
2.3.2.14.Aufbewahrung des Galektins .....	49
2.3.2.15.Western Blot.....	50
2.3.3. Biotinylierung von Galektin-1 und -3 und deren kinetische Interaktionsstudien am BLI .....	50
2.3.3.1. Biotinylierung von Galektin-1 und -3 .....	50
2.3.3.2. Kinetische Interaktionsstudien von AGPs mit humanen Galektinen am BLI .....	51
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1. Analytische Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
3.1.1. Ausbeuten der hochmolekularen Fraktionen, der Yariv-Fällungen, der Yariv- Überstände und des Arabinans .....	54
3.1.2. Geldiffusionstest .....	56
3.1.3. Charakterisierung des Kohlenhydratanteils .....	57
3.1.3.1. Analyse der Neutralzucker .....	57
3.1.3.2. Neutralzuckeranalyse der HMFs .....	58
3.1.3.3. Neutralzuckeranalyse der Yariv-Fällungen .....	60
3.1.3.4. Neutralzuckeranalyse der Yariv-Überstände .....	65
3.1.3.5. Neutralzuckeranalyse des Arabinans.....	67
3.1.3.6. Kolorimetrische Bestimmung der Uronsäuren .....	68
3.1.3.7. Neutralzuckeranalyse der uronsäurereduzierten AGPs .....	71
3.1.3.8. Neutralzuckeranalytik der partialhydrolysierten AGPs von <i>Ginkgo biloba</i> .....	74
3.1.3.9. Bindungstypanalyse .....	76
3.1.4. Charakterisierung des Proteinanteils .....	86
3.1.4.1. Gehaltsbestimmung von Hydroxyprolin in den AGPs.....	86

3.1.4.2.	Elementaranalyse.....	88
3.1.5.	Isolierung weiterer Polysaccharide aus <i>Ginkgo biloba</i> .....	89
3.1.5.1.	Ausbeuten der Extrakte .....	89
3.1.5.2.	Neutralzuckeranalyse der Extrakte.....	90
3.1.5.3.	Kolorimetrische Bestimmung von Uronsäuren der Extrakte.....	92
3.1.6.	Größenausschlusschromatographie mit Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS) .....	93
3.1.6.1.	Molekulargewichtsbestimmung .....	93
3.2.	Bindung von AGPs an Antikörper und Interaktionsstudien mit humanen Galektinen .....	96
3.2.1.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	96
3.2.1.1.	ELISA-Versuche mit den Gymnospermen-AGPs .....	97
3.2.1.2.	ELISA-Versuche mit dem nativen und den behandelten <i>Ginkgo</i> -AGPs.....	99
3.2.2.	Zellfreie Expression von Galektin-1 .....	101
3.2.3.	Interaktionsstudien von AGPs mit humanen Galektinen am BLI .....	102
3.2.3.1.	Interaktionsstudien mit Galektin-3 .....	103
3.2.3.2.	Interaktionsstudien mit dem zellfrei exprimierten Galektin-1.....	107
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>110</b>
<b>4.1.</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung der Gymnospermen-AGPs .....</b>	<b>110</b>
4.1.1.	Evolutionärer Hintergrund der Gymnospermen .....	110
4.1.2.	Isolierung und Charakterisierung der HMFs .....	111
4.1.3.	Isolierung weiterer Polysaccharidfraktionen aus <i>Ginkgo biloba</i> .....	114
4.1.4.	Isolierung und Charakterisierung der AGPs .....	116
4.1.5.	Bindung von AGPs an Antikörper .....	128
4.1.6.	Charakterisierung der Proteinanteile.....	131
4.1.7.	Bestimmung des Molekulargewichtes.....	132
<b>4.2.</b>	<b>Interaktionsstudien mit humanen Galektinen.....</b>	<b>134</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>140</b>

<b>6.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>142</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>144</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>167</b>
<b>8.1.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>167</b>
<b>8.2.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>168</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

3-O-Me-Rha	3-O-Methyl-Rhamnose
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
AcP	Acetylphosphat
AFM	<i>Atomic Force Microscope</i>
AG	Arabinogalactan
AGP	Arabinogalactan-Protein
Ala	Alanin
<i>Aqua bidest</i>	Bidestilliertes Wasser
<i>Aqua dem.</i>	Demineralisiertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Ara	Arabinose
ASF	Asialofetuin
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BLI	Bio Layer-Interferometrie
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Kohlenstoff
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
CECF	<i>Continuous-Exchange-Cell-Free-System</i>
CRD	<i>carbohydrat-recognition domains</i>
Da	Dalton
Dimsyl-	Dimethylsulfinyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTF	Endothelium-derived relaxing Faktor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EXT	Extensine
<i>f</i>	furanosidisch
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Feeding mixture
Fuc	Fucose
Gal-Zahl	Galektin-Zahl
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GÜG	Grundstoffüberwachungsgesetz
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
Hex	Hexose
His	Histidin
HMF	Hochmolekulare Polysaccharid-Fraktion
HRGP	Hydroxyprolinreiches Glykoprotein
HPLC	High-performance liquid chromatographie
Hyp	Hydroxyprolin
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
Ino	Inositol
IL	Interleukin
Jacq.	Jacquin

$k_a$	Geschwindigkeitsrate der Assoziation
$k_d$	Geschwindigkeitsrate der Dissoziation
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KH	Kaliumhydrid
KOH	Kaliumhydroxid
L.	Linneaus
LacNac	N-Acetyl-D-Lactosamin
LAG	Lärchen-Arabinogalactan
LB	Luria-Bertani-Medium
L-BMAA	$\beta$ -N-Methylamino-L-Alanin
Lehm.	Lehmann
MALLS	Multi-angle-laser-light-scattering
Man	Mannose
MCP	Modifiziertes Citruspektin
MCR	Molar Coupling Ratio
MTBST	TRIS-buffered saline mit Tween® 20 und Magermilchpulver
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular weight cutt-off
N	Stickstoff
$\text{NaBH}_4$	Natriumborhydrid
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysulfouccinimid
$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	Ammoniumoxalat
$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NTP	Nukleosidtriphosphat
<i>p</i>	pyranosidisch
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis



PEG	Polyethlenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PNS	Phosphate buffered saline
PMAA	Partiell methyliertes Alditol-Acetat
PPO	Polyphenoloxidase
PRP	Prolinreiches Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PS	Polystyrol
Pro	Prolin
Rha	Rhamnose
RCWMDE	L-Arginin, L-Cystein, L-Tryptophan, L-Methionin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure
RI	Refractive index
Rib	Ribose
RM	Reaction mixture
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
S	Schwefel
SA	Streptavidin-Sensor
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	Größenausschlusschromatographie
Ser	Serin
T	terminal
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween® 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TCM	Traditionell Chinesische Medizin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Thunb.	Thunberg
Xyl	Xylose



# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Systematik der Gymnospermen

Die Spermatophyta mit einer Gesamtanzahl von ca. 241 000 Arten umfassen die Gymnospermen sowie die Angiospermen. Zusätzlich zu ihrer Verwendung als Nahrungsmittel und Baustoffgrundlage sind sie aufgrund ihrer zahlreichen chemischen Inhaltsstoffe für den Menschen von großer Bedeutung (Gemeinholzer, 2018). Die aktuell lebenden Gymnospermen umfassen ein wenig mehr als noch 1 000 Arten (Wang und Ran, 2014) und bestehen aus den Ordnungen der Ginkgoales, Cycadales, Koniferen und Gnetales (Pires und Doland, 2012). Eine Übersicht der Systematik ist in Abbildung 1 dargestellt. Neue phylogenetische Studien zeigen, dass sich die Ordnung Ginkgoales vor Cycadales entwickelt hat und lassen eine sehr enge Verwandtschaft beider Ordnungen vermuten (Ran *et al.*, 2018). Die Koniferen umfassen die Gruppen der „Nadelbäume“, die 39% der weltweiten Waldoberfläche bilden (De La Torre *et al.*, 2019). Die Gymnospermen sind bedingt durch ihre lange Evolutionsgeschichte sehr gut an extreme Lebensbedingungen angepasst (Liesche *et al.*, 2011). Den Begriff der „Nacktsamer“ verdanken sie der Tatsache, dass die Samenanlagen im Gegensatz zu Angiospermen nicht von einem Fruchtblatt umhüllt werden (Davis und Schaefer, 2011). Die phylogenetischen Beziehungen zwischen den einzelnen Klassen der Gymnospermen untereinander und zu den Angiospermen sind bis heute nicht eindeutig geklärt und werden weiterhin diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den rezenten Gymnospermen nicht wie lange angenommen um eine paraphyletische, sondern um eine monophyletische Gruppe handelt (Forest *et al.*, 2018). Aufgrund immer wieder neuer Erkenntnisse der durchgeführten Genanalysen lassen sich aktuell keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Evolutionsgeschichte machen.

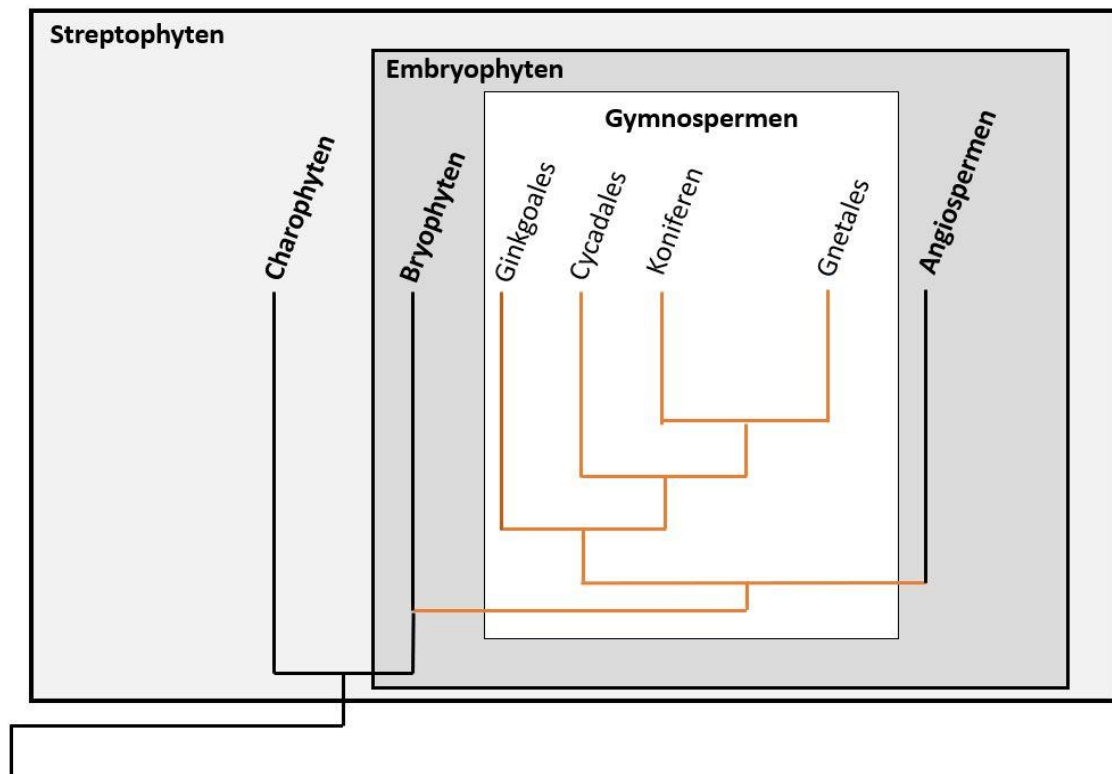


Abbildung 1: Detaillierte Darstellung der Systematik der Gymnospermen.

In veränderter Form in Anlehnung nach Pires & Doland, 2012

## 1.2. Die Pflanzen *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya*, *Cycas revoluta* und *Encephalartos longifolius*

### 1.2.1. *Ginkgo biloba* L.

*Ginkgo biloba* L. aus der Familie der Ginkgoaceae (siehe Abbildung 2) ist der einzige noch bekannte Vertreter der Ginkgoales und wird deswegen als „lebendes Fossil“ (Mohanta *et al.*, 2012) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine der ältesten lebenden Samenpflanzen. Hohmann *et al.* (2018) beschreiben einen Entstehungszeitpunkt *Ginkgo*-ähnlicher Arten vor ca. 300 Millionen Jahren. Isah (2015) gibt einen Zeitraum vor ca. 270 Millionen Jahren an. Weiterhin soll sich die Gattung *Ginkgo* vor ca. 170 Millionen Jahren entwickelt haben (Hohmann *et al.*, 2018). Aufgrund seiner markanten Charakteristika nimmt er eine Son-

derstellung unter den Gymnospermen ein (He *et al.*, 2016). Einheimisch ist der *Ginkgo biloba* Baum in China, Korea und Japan. Heutzutage sind weltweit Exemplare zu finden (Sun *et al.*, 2013).

Es handelt sich um einen diözischen Baum, der eine Höhe von 20-40 Meter erreichen kann.



Abbildung 2: *Ginkgo biloba* Baum

Die pyramidenähnliche Baumstruktur zeigt einen zentralen Stamm an dem sich diagonalwachsende, weiträumige Äste mit langen und kurzen Trieben befinden. Die sommergrünen Blätter (siehe Abbildung 3) sind langgestielt und zeigen eine Fächerform. Zudem sind sie zweilappig und zeigen eine wechselständige Anordnung (Isah, 2015). Die männlichen Bäume bilden an Kurztrieben zahlreiche kätzchenartige Blüten, die stark reduziert sind. Die Staubblätter bilden einen Stiel mit zwei Pollensäcken, die sich bei Pollenreife öffnen und über den Wind zur Samenanalyse transportiert werden. Die weiblichen Blüten be-

stehen aus einer Samenanlage mit äußerem Integument und einer Mikropyle. In Inneren der Samenanlagen befindet sich das vom Integument umhüllte Megasporangium, in welchem sich die Megaspore entwickelt. Der Pollen keimt und entlässt spiralig begeißelte Spermatozoiden. In der Regel erfolgt die Verschmelzung der Spermatozoiden mit der Eizelle erst vier bis sieben Monate nach der Bestäubung sowie einige Wochen nach dem Abfall der Samenanlagen von der Mutterpflanze. Die äußere Schicht des Samens ist fleischig und riecht stark nach Buttersäure, um von Tieren verbreitet zu werden (Gemeinholzer, 2018).



Abbildung 3: Gesammelte Blätter vom *Ginkgo biloba* Baum

Wesentliche Inhaltsstoffe der Blätter sind über 30 Flavonoide (Ude *et al.*, 2013; Ban *et al.*, 2020), wie Flavonoidglykoside von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin sowie Flavone,

Flavonole, Biflavone wie Ginkgetin und Isoginkgetin (Mullaicharam, 2013). Die Flavonoide zeichnen sich durch vielfältige Wirkungen aus. Sie wirken oxidativ (DeFeudis *et al.*, 2002; Ellnain-Wojtaszek *et al.*, 2002; Zuo *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2019), agieren als freie Radikalfänger (Zuo *et al.*, 2017) und zeigen antiallergische (Tao *et al.*, 2019), antientzündliche (Li *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2019), neuroprotektive und *in vitro* antikanzerogene Effekte (Li *et al.*, 2019).

Die Terpenfraktion besteht zu 3,1% aus den Ginkgoliden A, B, C, J, wobei letzteres nur in Blättern gefunden wurde sowie M, welches ausschließlich in den Wurzeln nachgewiesen werden konnte (Nakanishi, 2005) sowie aus ca. 2,9% Bilobalid (siehe Abbildung 4) (Rojas *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2020). Einige der multifaktorellen pharmakologischen Aktivitäten des Extraktes sind neben dem bereits aufgeführten Effekt der Flavonoide, die pharmakologischen Eigenschaften der Terpenoide wie die Beeinflussung des Plättchen aktivierenden Faktors (PAF) bei zerebralen Gefäßerkrankungen (Liu *et al.*, 2019), die Inhibition der  $\beta$ -Amyloid-Peptid-Aggregation bei Alzheimer-Erkrankung (Wu *et al.*, 2006) sowie die Stimulation des *Endothelium-derived relaxing Factors* (EDRF) zur verbesserten Blutzirkulation (Sadowska-Krepa *et al.*, 2017).

Weitere Inhaltsstoffe sind Proanthocyanidine, Alkylphenole, phenolische Säuren sowie Polyphenole (Isah, 2015).

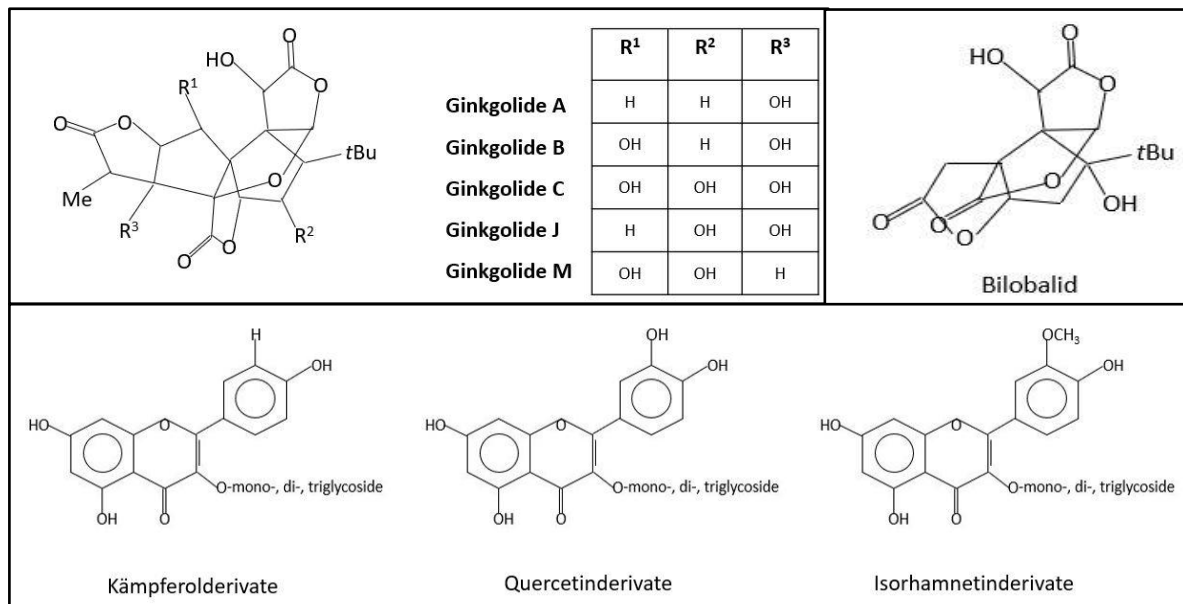


Abbildung 4: Pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe des *Ginkgo biloba* Extraktes EGb 761®.

In Anlehnung nach Shi *et al.*, 2010: A: Ginkgolide A, B, C, J, M; B: Flavonoidderivate.

In Anlehnung nach Liu *et al.*, 2018: C: Bilobalid

Als Arzneidroge wird der standardisierte Extrakt der noch grünen frischen oder getrockneten Blätter verwendet. Die Droge wird aus Wildkulturen aus Südfrankreich, Kalifornien, Südkorea und China gewonnen (Hänsel und Hölzl, 2013; Lee und Birks, 2018).

Im Europäischen Arzneibuch werden die zerkleinerten und getrockneten Ginkgoblätter *Ginkgo folium* mit einem Mindestgehalt von 0,5% an Flavonoide (berechnet als Flavonoidglykosid) bezogen auf die eingesetzte getrocknete Droge verwendet (Ph. Eur, 2017). Bei den pharmazeutisch eingesetzten *Ginkgo biloba* Extrakten EGb 761® und LI 1370® handelt es sich um einen standardisierten Spezialextrakt aus den Blättern (Ude *et al.*, 2013). Die Kommission E schreibt für diese in ihrer Monographie einen Flavonoidglykosidgehalt von 22-27%, einen Gesamtterpenlactongehalt von 5-7% inklusive der Ginkgolide A, B, und C (2,8-3,4%), einen Bilobalidgehalt (2,6-3,2%) sowie eine Konzentration der Ginkgolsäure von weniger als 0,05 ppm vor (Ude *et al.*, 2013; Hashiguchi *et al.*, 2015; Zuo *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020). Letztere weist unter anderem ein allergisches und gentoxisches Potenzial auf (Ahlemeyer *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009).

Die Anwendungsgebiete des *Ginkgo biloba* Extraktes wurden in der Monographie der Kommission E aus dem Jahre 1994 folgend aufgeführt (Fintelmann und Weiss, 2009):

- Symptomatische Behandlung von hirnorganisch bedingten Leistungsstörungen im Rahmen eines therapeutischen Gesamtkonzepts beim demenziellen Syndrom (zur primären Zielgruppe gehören demenzielle Syndrome bei primär degenerativer Demenz, vaskulärer Demenz und Mischformen aus beiden).
- Verbesserung der schmerzfreien Gehstrecke bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit im Stadium II nach Fontaine (Claudicatio intermittens) im Rahmen physikalisch therapeutischer Maßnahmen (vor allem Gehtraining)
- Schwindel
- Tinnitus

Der Extrakt (35-67:1) EGb 761<sup>®</sup> wird als 60%iger (m/m) Acetonextrakt von der Firma Dr. Wilmar Schabe GmbH & Co. KG in Karlsruhe, Deutschland, unter dem Handelsnamen Tebonin<sup>®</sup> vertrieben (Gauthier und Schlaefke, 2014; Ude *et al.*, 2013). Der LI Extrakt 1379<sup>®</sup>, mit dem Handelsnamen Kaveri<sup>®</sup>, stammt von Lichtwer Pharma GmbH aus Berlin (Ude *et al.*, 2013).

### 1.2.2. *Ephedra distachya* L.

Die Gattung *Ephedra* (Meerträubel) der Familie Ephedraceae aus der Ordnung der Gnetales umfasst 40 Arten (Danciu *et al.*, 2019), die überwiegend strauchförmig wachsen und in den Regionen Südamerika, Sahara, Mittelmeerraum und Asien beheimatet sind. Die Teilung der Klasse Gnetopsida in die drei Familien Ephedraceae, Welwitschiaceae sowie Gnetaceae soll vor ca. 146 Millionen erfolgt sein (Wang *et al.*, 2019).

Alle Vertreter der Familie sind basal verholzt und weisen im Gegensatz zu allen anderen Nacktsamern Tracheen auf. Die Blätter sind häufig zu Schuppen reduziert, wobei die grünen Zweige die Photosynthese übernehmen. Die männlichen Blüten stehen einzeln oder zu zweit/zu dritt an den Nodien (Knoten). Diese haben eine Hülle aus zwei basal verwachsenen Schuppenblättern, aus der die endständig verwachsenen Pollensäcke herausragen. Die weiblichen Blüten sitzen gegenständig oder zu Wirteln an einem Knoten. Diese besitzen ein Paar verwachsener, ledriger Schuppen, die bei der Reife eine fleischig rote Farbe zeigen (Gemeinhauser, 2018).



In dieser Arbeit wurden die oberirdischen Teile der Pflanze *Ephedra distachya*, Gewöhnliches Meerträubel, verwendet (siehe Abbildung 5), deren Verbreitungsgebiet Europa bis



Abbildung 5: Habitus von *Ephedra distachya*

Asien umfasst. Es handelt sich um ein aufsteigendes, nahezu blattloses, bis zu 1 Meter großes Ru-  
tengewächs. Die Zweige sind meist gerade, bis zu  
2 mm dick und fein gestreift. Sehr auffällig sind  
die roten Beerenzapfen, die eine Länge von ca. 6  
bis 7 mm aufweisen und kugelig erscheinen  
(Dengler *et al.*, 2013). Die wesentlichen Inhalts-  
stoffe der Gattung sind die herzkreislaufwirksa-  
men Alkaloide Ephedrin, Norephedrin, Pseudo-  
ephedrin, Methylephedrin und Methylpseudo-  
ephedrin. Weitere pharmazeutisch unbedeuten-  
dere Inhaltsstoffe sind Polysaccharide, Flavono-  
ide und Tannine (Fan *et al.*, 2015), Calciumoxalat-  
kristalle und Mineralien (Ibragic und Soifc, 2015)

Die orale Einnahme von Ephedrin-Alkaloiden bewirkt aufgrund der sympathomimetischen Wirkung durch eine Aktivierung der adrenergen Rezeptoren eine Aktivitätssteigerung des Herzkreislaufsystems (Stohs und Badmaev, 2016), welche sich in einer Steigerung des Blutdrucks und der Herzaktivität (Brown *et al.*, 2012; Hassani *et al.*, 2018) sowie in einer Erweiterung der Bronchien äußert (Hassani *et al.*, 2018).

Im Europäischen Arzneibuch ist das *Ephedra herba* der Pflanzen *Ephedra sinica*, *Ephedra intermedica* sowie *Ephedra equisetina* aufgeführt. Der Gehalt an Ephedrin muss mindestens 1% bezogen auf die getrocknete Droge betragen (Ph. Eur., 2017).

In der Traditionell Chinesischen Medizin (TCM) wurde *Ephedra herba* der Pflanze *Ephedra sinica* bereits vor 5 000 Jahren als Stimulanz und aufgrund des antiasthmatischen Effektes angewendet (Abourashed *et al.*, 2003). Seit 2006 ist *Ephedra herba* in die Arzneimittelverschreibungsverordnung aufgenommen und damit rezeptpflichtig. Ein Jahr später stellte das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) *Ephedra herba* zusätzlich unter das Grundstoffüberwachungsgesetz (GÜG) (BfArM-Mitteilung). Weiterhin wird seit

1990 Ephedrin in Verbindung mit Coffein zur Stimulation der Gewichtsabnahme missbräuchlich angewendet (Liu *et al.*, 2013). Heutzutage wird in Deutschland Ephedrinhydrochlorid zur Behandlung einer Hypotonie während einer Spinal-, Epidural- oder Allgemeinanästhesie sowie Ephedrinhemisulfat als Vasokonstriktor zur Nasenschleimhautabschwellung in dem rezeptfreien Arzneimittel Wick Medi Nait® eingesetzt (Gelbe Liste).

### 1.2.3. *Cycas revoluta* Thunb. und *Encephalartos longifolius* (Jacq.) Lehm

Die ersten Vertreter der Cycadales (Palmfarne) entstanden je nach Literaturangabe vor 200-300 Millionen Jahren (Brenner *et al.*, 2003, Yamada *et al.*, 2012; Roodt *et al.*, 2017; Nadarajan *et al.*, 2018; Mankga *et al.*, 2020). Heute existieren 10 Gattungen, 3 Familien und



Abbildung 6: Habitus von *Cycas revoluta*

348 Arten (Nadarajan *et al.*, 2018). Die Arten besitzen in Europa keine pharmazeutische Relevanz und werden vorwiegend als Zierpflanzen kultiviert. Ihr natürlicher Lebensraum ist die Südhemisphäre mit Wald- und Savannenstandorten in tropischen oder subtropischen Regionen, wie Australien und südliches Afrika. Die Palmfarne besitzen Stämme, die entweder baumförmig oder unterirdisch bzw. bodennah knollig gedrungen sind. Die Blätter sind meist gefiedert und bilden terminal einen Blattschopf. Die Wurzeln sind in der Lage sukulent zu werden und dienen damit als Speicherwurzel (Gemeinhauser, 2018). Zudem bilden sie

knapp unter der Bodenoberfläche Korallenwurzeln, die Cyanobakterien einen Lebensraum bieten können (Yamada *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2019). Bedingt durch diese Symbiose können sie auch nährstoffarme Böden besiedeln. Palmfarne sind diözisch (Krieg *et al.*, 2017). Die gebildeten Zapfen können bis zu 75 cm lang und 40 kg schwer werden (Gemeinhauser, 2018). In dieser Arbeit wurden die Blätter ohne Mittelrippe des Japanischen Palmfarns *Cycas revoluta* aus der Familie der Cycadaceae verwendet (siehe Abbildung 6), der namensgebend in Japan beheimatet ist (Kanesaki *et al.*, 2018). Es handelt sich um einen

nur wenige Meter hoch werdenden Baum, der sich durch die schmal-linealischen, spitzen, oberseits glänzend dunkelgrünen, am Rande zurückgerollten Fiedern seiner Laubblätter und durch die filzartigen Fruchtblätter auszeichnet (Müller, 2013).

Zusätzlich wurden die Wedel ohne Stiel des Suurberg-Brotpalmfarns *Encephalartos longifolius* genutzt. Bei *Encephalartos* (Brotpalmfarne) handelt es sich um eine Pflanzengattung aus der Familie der Zamiaceae, welche mit 65 Arten in Süd- sowie Ostafrika beheimatet ist (Downie *et al.*, 2008; Yessoufou *et al.*, 2013).

Über die Inhaltstoffe der Blätter von *Cycas* ist bislang wenig bekannt. Als wesentliche Bestandteile konnten Biflavonoide und phenolische Säuren identifiziert werden (Moawad *et al.*, 2010) sowie karzinogene Substanzen wie Cycasin und die neurotoxische Aminosäure  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanin (L-BMAA) (Schneider *et al.*, 2003; Kisby *et al.*, 2013). Arshad *et al.* (2019) berichten über narkotische, aphrodisierende und stimulative Effekte von *Cycas revoluta* sowie über einen volksmedizinischen Einsatz aufgrund eines antidiabetischen Effektes. In der TCM werden die Samen als Antirheumatikum, Expektoranz und Tonikum angewendet (Moawad *et al.*, 2010).

### 1.3. Die pflanzliche Zellwand

Aus heutiger Sicht betrachtet man die Zellwand als ein metabolisch dynamisches Kompartiment mit vielen spezifischen und wichtigen Funktionen (Evert, 2009; Steinwand und Kieber, 2010). So spielt sie eine große Rolle beim Wachstum und der Entwicklung der Pflanze, in der Interaktion mit der Umwelt in der intrazellulären Signalkommunikation (Showalter, 1993) und bei der Abwehr von Pathogenen (Steinwand und Kieber, 2010). Zudem ist sie heutzutage von großem Interesse für die menschliche und tierische Ernährung sowie als Rohstoff für die Textil- bzw. Papierindustrie (Yin *et al.*, 2010). Die pflanzliche Zellwand lässt sich in zwei Abschnitte einteilen. Die primäre Zellwand schließt an die nach der Mitose gebildeten Mittellamelle an. Die sekundäre Zellwand verleiht der Zelle im verstärkten Maße Stabilität (Peralta *et al.*, 2017).

Die pflanzliche primäre Zellwand ist eine extrazelluläre Matrix und besteht im Wesentlichen aus den vier Polysacchariden Cellulose, verschiedene Hemicellulosen (Xylane, Xyloglucane und Glucomannane; Peralta *et al.*, 2017), Pektinen sowie teilweise auch aus Callose (Egelund *et al.*, 2004). Die sekundäre Zellwand besteht überwiegend aus Cellulose, Hemicellulosen, sowie Lignin (Zhong und Ye, 2014). Weitere Bestandteile sind Proteine, die als Hydroxyprolinreiche Glykoproteine (HRGPs) bezeichnet werden. Diese Gruppe umfasst vor allem Glykoproteine wie Extensine sowie die Arabinogalactan-Proteine (AGPs) (Tan *et al.*, 2013).

Während der Evolution mussten die Pflanzen sich an die Faktoren der Umwelt wie Wittereinflüsse, UV-Strahlung und Pathogenabwehr anpassen, um ihr Überleben zu sichern. Diese Anforderungen verlangten auch eine spezifische Anpassung der pflanzlichen Zellwandstruktur.

So konnten zahlreiche unterschiedliche Zusammensetzungen der Zellwandbestandteile in diversen Pflanzen analysiert werden. In Bryophyten und Charophyten kann die Zellwand nicht eindeutig zwischen einer primären und sekundären Zellwand unterschieden werden (Sarkar *et al.*, 2009).

## 1.4. Arabinogalactane (AGs) und Arabinogalactan-Proteine (AGPs)

### 1.4.1. AGs

Arabinogalactane kommen als reine Polysaccharide ohne Proteinteil in verschiedenen Pflanzen vor. Nach Aspinall *et al.* (1982) lassen sich die AGs in zwei Typen einteilen.

**Typ I** zeigt als Hauptkette lineare  $\beta$ -1,4-D-Galactose und ist an der Position C-3 mit einer  $\alpha$ -Arabinose verknüpft (Clarke *et al.*, 1979; Hinz *et al.*, 2005). Dieser Typ ist weiterhin als Verknüpfung zu Rhamnogalacturonan-I-Regionen (RG I) von Pektinen beobachtet worden (Hinz *et al.*, 2005) (siehe Abbildung 7 A). Die kommen als pektinische Komplexe in Blättern, Knospen und Samen vor (Clarke *et al.*, 1979).

**Typ II** AGs besitzen eine  $\beta$ -1,3-Galactankette, welche teilweise an Position C-6 mit  $\beta$ -1,6-Galactose verknüpft ist und häufig ein Molekulargewicht von 5-25 kDa besitzt (Ellis *et al.*,

2010). Weiter vorkommende Monosaccharide in den Seitenketten sind vor allem Arabinose, Rhamnose, Xylose und Glucuronsäure (Pellerin *et al.*, 1995). Dieser Typ kann ebenfalls als Bestandteil der Seitenketten von Pektinen vorkommen (Nothnagel, 1997) oder über eine kovalente Bindung mit einem Protein verknüpft sein und damit zu einem AGP werden (siehe Abbildung 7 B). Dieser Typ wurde ohne Proteinteil in Lärchen wie in *Larix laricina* nachgewiesen (LAGs) (Göllner *et al.*, 2011; Dion *et al.*, 2016). So konnte beispielsweise ein AG Typ II mit einer Größe von 29 kDa aus dem Holz von *Larch sibirica* isoliert werden (Karácsonyi *et al.*, 1984).

Weiterhin wurde ein **Typ III** nach Clarke *et al.* (1979) aus *Lolium*-Arten (Poaceae) vorgeschlagen. Das Grundgerüst aus 1,3-Galactose ist an Position 6 mit 1,6-Galactoseeinheiten verknüpft. An diesen kann in Position 3 1-Arabinose gebunden sein. Endständige Galactose kann in Position 3 und 6 ebenso mit 1-Arabinose verknüpft sein.

Ein weiterer Strukturtyp III wurde von Léonard *et al.* (2010) vorgeschlagen, welcher aus den Allergenen Art v 1 von *Artemisia vulgaris* und Amb a 4 von *Ambrosia artemisiifolia* erstellt werden konnte. Art v 1 zeigt eine kurze Kette von  $\beta$ -D-Galp (1,6), welche mit Hydroxyprolin verknüpft ist. Dieser besteht nur aus einer Verknüpfung von wenigen Galactosen als Hauptkette und Arabinose in den Seitenketten, die teilweise stark verzweigt sein können. So wurden terminale 1-Araf, 5-Araf, 3,5-Araf, 2,5-Araf, 2,3,5-Araf, und als Galactoseanteil 3,6-Galp nachgewiesen (siehe Abbildung 7 C). Diese Verbindung reagiert mit dem Yariv-Reagenz und stellt damit ein AGP dar. Amb a 4 zeigte leichte Variationen der Zusammensetzung (Hijazi *et al.*, 2014).

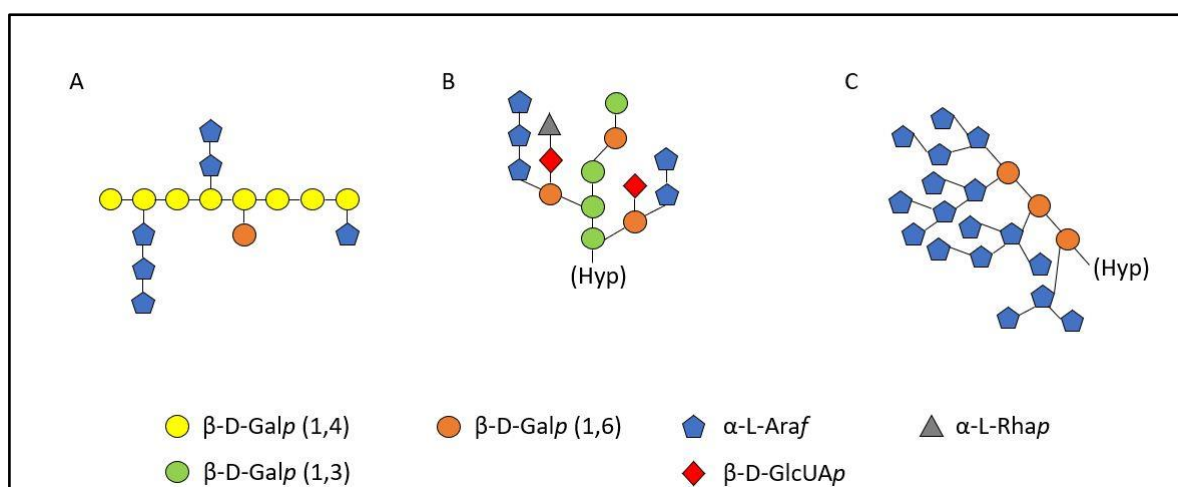


Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen AG- bzw. AGP-Typen nach Hijazi *et al.*, 2014

### 1.4.2. AGPs

AGPs zählen zu den komplexesten und hochmolekularen Inhaltsstoffen der pflanzlichen Zellwand. Die AGPs gehören neben den mäßig glykosylierten Extensinen (EXTs) und leicht glykosylierten prolinreichen Proteine (PRPs) zu der Klasse der hydroxyprolinreichen Glykoproteine (HRGPs) und bestehen im Wesentlichen aus einem AG Typ II, welcher 90-99% des Moleküls ausmacht und einem rückenbildenden hydroxyprolinreichen Proteinanteil, welcher zwischen 1-10% liegt. Der Kohlenhydratanteil umfasst die Monosaccharide Arabinose und Galactose sowie in geringeren Mengen weitere Monosaccharide. Neben Hydroxyprolin dominieren häufig die Aminosäuren Prolin (Pro), Serin (Ser), Threonin (Thr) sowie Alanin (Ala) (Ellis *et al.*, 2010). Bedingt durch die Variationen der Kohlenhydratzusammensetzung, der Aminosäuresequenz und deren *O*- oder *N*-glykosidische Verknüpfung existiert eine große Vielzahl im strukturellen Aufbau.

AGPs konnten in höheren Pflanzen (Classen *et al.*, 2000), Moosen (Fu *et al.*, 2007; Bartels *et al.*, 2017; Classen *et al.*, 2019; Happ und Classen, 2019), Farnen (Bartels und Classen, 2017; Classen *et al.*, 2019) und einigen Gymnospermen (Makarova *et al.*, 2015) nachgewiesen werden. AGPs kommen in verschiedenen Pflanzenorganen wie Blättern, Blütenbestandteilen, Samen und Wurzeln vor (Nothnagel, 1997). So wurden sie auch in den Zellwänden der Tracheiden von verschiedenen *Pinus*-Arten mit Hilfe monoklonaler Antikörperreaktionen und eines Transmissionselektronenmikroskops nachgewiesen (Altaner *et al.*, 2010). Zudem wurden in den Zellwänden der Pollenkörner verschiedener Gymnospermen AGP-Epitope gefunden (Fernando *et al.*, 2010; Nguema-Ona *et al.*, 2012).

### 1.4.3. Funktionen

Die AGPs sind in der Zellwand und in der extrazellulären Matrix lokalisiert und können teilweise über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Plasmamembran verankert sein. Eine Abspaltung der AGPs vom GPI-Anker ist durch den Einfluss einer spezifischen Phospholipase möglich, z.B. um zelluläre Signale zu beantworten (Costa *et al.*, 2013). Nach Seifert und Roberts (2007) deutet dieses auf eine Vermittlerfunktion der AGPs

zwischen Plasmamembran, Zellwand und Cytosol hin. Die detaillierten Funktionen sind bis heute nicht ausreichend geklärt worden. Die AGPs scheinen eine wesentliche Rolle beim Zellwachstum und der Zellentwicklung (Kishor *et al.*, 2015) sowie der Zellexpansion, Zellteilung, Xylemdifferenzierung und der somatischen Embryogenese zu spielen (Gao und Showalter, 1999; Tang *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2012). Vom pharmazeutischen Interesse ist die immunstimulierende Wirkung, welche für einige AGPs *in vitro* gezeigt werden konnte. Ein AGP aus *Echinacea* zeigt *in vitro* eine Aktivierung des Komplementsystems (Alban *et al.*, 2002) sowie eine Bindung an Leukozyten (Thude *et al.*, 2006). Für die AGPs aus *Baptisia* und *Echinacea* konnte *in vitro* ein Einfluß auf die Proliferation, Immunglobulin-M-Produktion (IgM), Nitrit- und Interleukin6-Produktion (IL6) von Maus-Lymphozyten nachgewiesen werden (Classen *et al.*, 2006).

#### 1.4.4. Detektion und Isolierung

Ein wesentliches Instrument zur Isolierung, Färbung und Quantifizierung der AGPs ist das Yariv-Reagenz (1,3,5-Tri(*p*- $\beta$ -D-glycosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzol) (Yariv *et al.*, 1967), ein Phenylglykosid (Kitazawa *et al.*, 2013). Die diversen Phenylglykoside unterscheiden sich in der Isomerisierung der Hydroxylgruppe am C-2-Atom (Guan und Nothnagel 2004). Die Phenylglykoside ( $\beta$ -D-Glc)<sub>3</sub> und ( $\beta$ -D-Gal)<sub>3</sub> sind in der Lage eine Bindung mit den AGPs einzugehen, wohingegen ( $\beta$ -D-Man)<sub>3</sub> und ( $\alpha$ -D-Gal)<sub>3</sub> nicht zu einer Bindung befähigt sind (Mollet *et al.*, 2002). Der Mechanismus der Interaktion ist noch nicht vollständig geklärt und es existieren verschiedene Theorien über die strukturellen Voraussetzungen im Yariv-Reagenz bzw. im AGP (Kitazawa *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2018). Als strukturelle Voraussetzung im Yariv-Reagenz ist die  $\beta$ -Verknüpfung von D-Zuckern oder die  $\alpha$ -Verknüpfung von L-Zuckern innerhalb eines  $\beta$ -D-Yariv-Reagenz-Molekül wichtig. Weiterhin muss, wie bereits aufgeführt, die OH-Gruppe am C-2-Atom in der D-Glc-Konfiguration und zusätzlich die Diazogruppe am Phenylring in der C-4 Position vorliegen. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass in wässriger Lösung bis zu 300 Einheiten und in einer 1%igen NaCl-Lösung etwa 150 Einheiten aggregieren (Paulsen *et al.*, 2014).



### 1.4.5. Biosynthese

Die Biosynthese der Glykoproteine der pflanzlichen Zellwand findet im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie Golgi-Apparat mit einem nachfolgenden Vesikeltransport zur Zelloberfläche statt (Nothnagel, 1997). Die Hydroxylierung von Prolin wird durch das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase katalysiert (Hill *et al.*, 2000). Anschließend findet die O-Glykosylierung über eine Galactosyltransferase statt, welches eine Galactoseeinheit an Hydroxyprolin bindet (Showalter und Basu, 2016). Die nachfolgende Glykosylierung wird innerhalb des Golgi-Netzes abgeschlossen. Der Transport zur Plasmamembran verläuft über Vesikel (Ellis *et al.*, 2010). Abhängig vom Proteinaufbau unterscheidet man zwischen klassischen und nicht-klassischen AGPs. Klassische AGPs besitzen eine N-terminale Signalsequenz, eine zentrale Prolin-, Alanin-, Serin-, Threonin- („PAST“) reiche Domäne und am C-terminalen Ende eine hydrophobe Domäne zur Plasmamembranbindung über einen GPI-Anker (Youl *et al.*, 1998; Oxley und Bacic, 1999; Ma *et al.*, 2018). Nicht klassische AGPs besitzen größere Mengen an Asparagin oder Histidin (Rumyantseva, 2005) sowie Cystein (Ma *et al.*, 2018). Weiterhin können die Hydroxyprolin- und Alanin-reichen Regionen in geringerer Menge ausfallen (Rumyantseva, 2005). Eine hydrophobe Region, welche vermutlich für die Bindung an den GPI-Anker verantwortlich ist, fehlt hier (Mareri *et al.*, 2018).

### 1.4.6. Räumliche Struktur

Die räumliche Struktur der AGPs in Form eines „*wattle-blossom*“-Modells wurde zuerst durch Fincher *et al.* (1983) beschrieben (siehe Abbildung 8 A). Dieses ist durch ein Protein-Rückgrat gekennzeichnet, welches verzweigte AG-Seitenketten enthält. Analysiert wurde diese Struktur aus *Gummi arabicum*. Eine weitere Struktur beschreibt Qi *et al.* (1991) bei der das AGP einem verdrehten, haarigen Seil (*twisted hairy rope model*) ähnelt (siehe Abbildung 8 B). Mittels einer Transmissionselektronenmikroskopie und der Rasterkraftmikroskopie (AFM) wurden von Sanchez *et al.* (2007) die Tertiärstruktur des AGs aus *Gummi arabicum* untersucht, welches eine scheibenförmige Struktur beschreibt (siehe Abbildung 8 C).



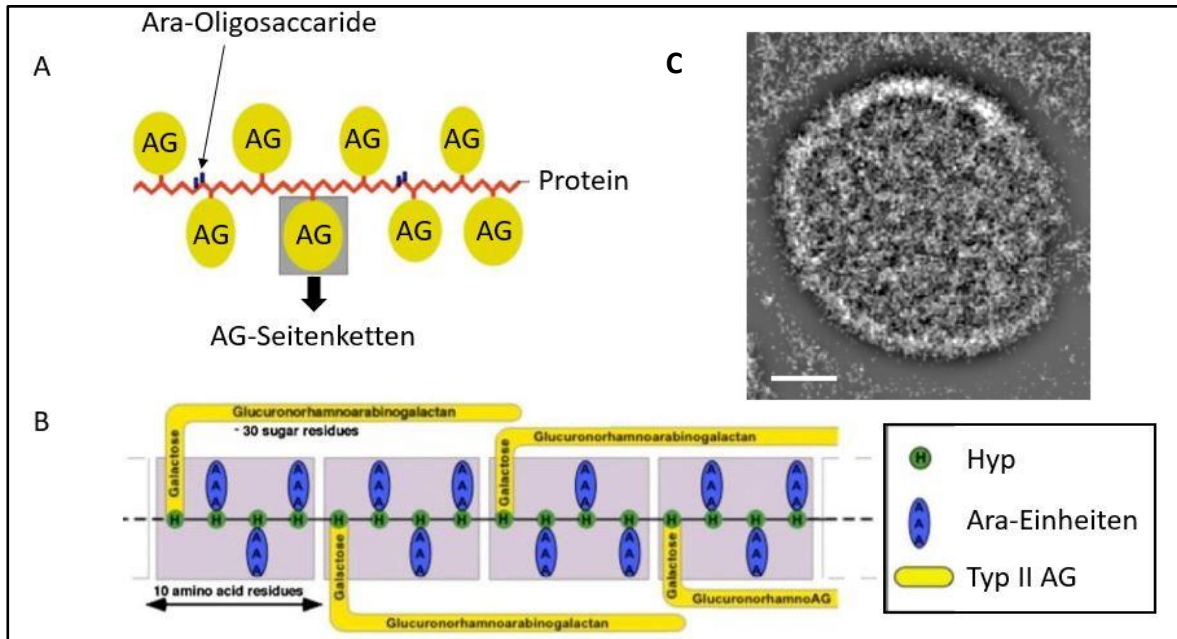


Abbildung 8: Strukturmodelle der Arabinogalactan-Proteine

A: *wattle blossom Modell*, B: *twisted hairy rope Modell*. Jeweils in Anlehnung nach Ellis *et al.*, 2010.

C: Scheibenförmige Struktur. Entnommen aus Sanchez *et al.*, 2007

## 1.5. Humane Galektine

### 1.5.1. Allgemeines

Bei den Galektinen handelt es sich um eine stark konservierte Familie von  $\beta$ -Galactosidbindenden Lektinen, die aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Funktionen und pathologischen Beeinflussung immer mehr in den Blickpunkt der medizinischen Forschung geraten sind (Dings *et al.*, 2018; Pal *et al.*, 2019). Heutzutage sind bislang 15 humane Galektine entdeckt worden, die in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Galektine vom Prototyp (Gal-1,-2,-5,-7,-10,-11,-13,-14,-15), Chimären-Typ (Gal-3) und vom *Tandem-repeat*-Typ (Gal-4,-6,-8,-9 und -12) (Di Lella *et al.*, 2011; Rapoport und Bovin, 2015; Unverdorben *et al.*, 2016) (siehe Abbildung 9). Die wesentlichen Unterscheidungsmerkmale der Gruppen liegen in der Anzahl der *carbohydrat-recognition domains* (CRD), Präsenz oder Länge der mit den-

CRDs verknüpften Proteine, N-/C-terminale Endungen und Homologie der Aminosäuresequenz (Yoshino *et al.*, 2008). Eine CRD besteht aus ca. 130 Aminosäuren und ist verantwortlich für die spezifische Kohlenhydratbindung (Nakahara und Raz, 2007; Argueso *et al.*, 2015). Die Galektine der Proto-Typen besitzen eine CRD (Earl *et al.*, 2010), ebenso wie der chimäre Typ Galektin-3 (Rabinovich, 2005). *Tandem repeat* Galektine verfügen über zwei verschiedene CRDs (Earl *et al.*, 2010). Einige der proto-typischen Galektine sind in der Lage Homodimere zu bilden (Bi *et al.*, 2008; Rabinovich, 2005), weiterhin kann Galektin-3 als Pentamer vorkommen (Ahmad *et al.*, 2004; Nakahara und Raz, 2007). Die biologischen Funktionen der Galektine sind äußerst vielfältig. So können sie extrazelluläre Prozesse wie z.B. die Interaktion mit Glykoproteinen zur zellulären Signalvermittlung, intrazelluläre Prozesse, wie z.B. die Protein-Protein-Interaktion beeinflussen (Bibens-Laulan und St-Pierre, 2017; Stegmayer *et al.*, 2019). Hierdurch beeinflussen sie diverse biologischer Funktionen, wie Zelladhäsion, Zellwachstum sowie Apoptose und spielen damit eine große Rolle bei zahlreichen Erkrankungen (Perillo *et al.*, 1998; Yang und Liu, 2003; Chien *et al.*, 2017).

Eines der am besten erforschten Galektine ist das Galektin-3, welches sowohl im Cytoplasma als auch auf der Oberfläche von Zellen vorkommt und wesentliche Funktionen bei verschiedenen physiologischen Vorgängen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose sowie pathophysiologischen Vorgängen wie Tumorangiogenese übernimmt (Fortuna-Costa *et al.*, 2014). So konnte eine vermehrte Galektin-3 Expression beim Gebärmutterhalskrebs festgestellt werden (Chetry *et al.*, 2018).

Für die kohlenhydratbezogene Bindung der Galektine ist die Struktur des aus Glucose und Galactose bestehenden Disaccharides Lactose die minimal benötigte Interaktionsanforderung. Eine Veränderung der chemischen Struktur kann die Bindungsaffinität weiter erhöhen. So bindet N-Acetyllactosamin um das Fünffache besser an Galektin-3. Die Bindungsaffinität wird zusätzlich durch größere Oligosaccharide, wie  $\beta$ -(1,3)-verknüpfte PolyNAc-Lactosamin-Glykane erhöht, wie sie in der extrazellulären Matrix und auf der Zelloberfläche vorkommen (Dings *et al.*, 2018).

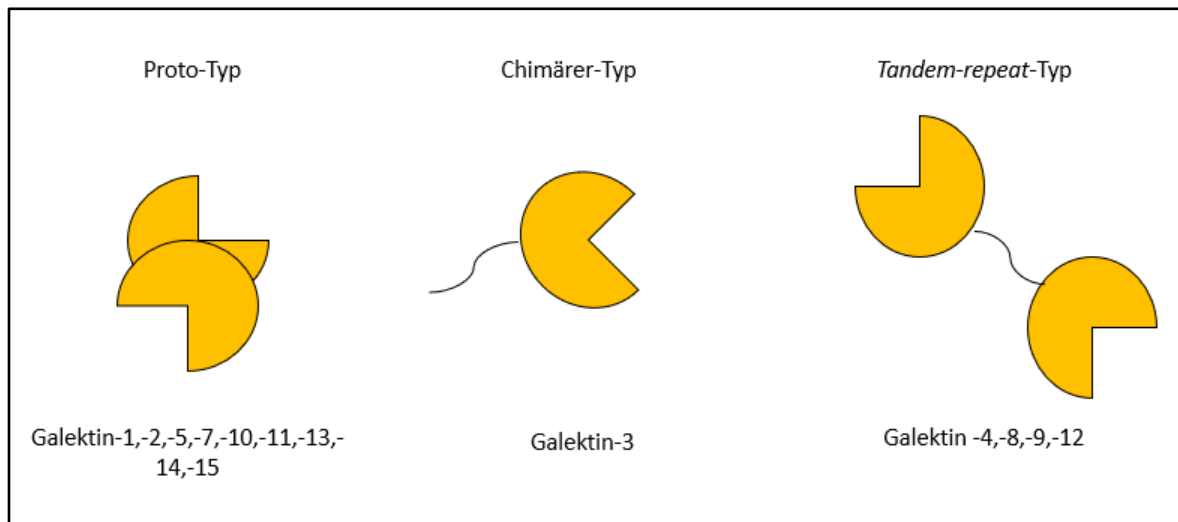


Abbildung 9: Klassifizierung und schematische Darstellung humaner Galektine in

Anlehnung an Xiao *et al.*, 2018

### 1.5.2. Bindung von pflanzlichen Polysacchariden an humane Galektine

Aufgrund ihres Interaktionsvermögens mit humanen Galektinen geraten pflanzliche Polysaccharide immer mehr in den Blickpunkt der Forschung. Besonderes Interesse gilt bisher Pektinen, dem modifizierten Citruspektin (MCP) sowie Galactomannanen.

Das Rückgrat des Pektins besteht wesentlich aus 1,4-verknüpften  $\alpha$ -D-Galacturonsäuren. Aufgrund möglicher Variationen in der Zusammensetzung des Rückgrats und zusätzlicher Verknüpfungen, werden die Pektine in unterschiedliche Typen eingeteilt. Die Haupttypen sind Rhamnogalacturonan I (RG I), Homogalacturonan (HG) und Rhamnogalacturonan II (RG II) (Stegmayer *et al.*, 2016). RG I besteht aus den kontinuierlichen Disaccharideinheiten  $\alpha$ -1,4-Galacturonsäure- $\alpha$ -1,2-Rhamnose. Von diesen sind 20-80% der Rhamnoseeinheiten im *Backbone* mit unterschiedlichen Seitenketten wie  $\beta$ -1,4-Galactan, Arabinanen und/oder AGs verknüpft (Yoo *et al.*, 2012). Aufgrund ihrer Komplexität und des hohen Molekulargewichtes werden Pektine häufig mittels alkalischer, saurer und/oder enzymatischer Hydrolyse modifiziert. Hieraus entstehen modifizierte Fragmente mit niedrigerem Molekulargewicht wie MCP (Stegmayer *et al.*, 2016). Dieses wird z.B. aus der Schale von Citrusfrüchten gewonnen. Für diese kleinere, nicht verzweigte und galactosereiche Kohlenhydratkette sind bereits mehrere Interaktionen mit Galektin-3 berichtet worden (Lu *et al.*, 2017; Martínez-Martínez *et al.*, 2018). Weiterhin konnten von diesem Galektin Interaktionen mit Rhamnogalacturonan I berichtet werden (Gao *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2017). Das Produkt Davanat® beinhaltet ein 59 kDa schweres Galactomannan, welches aus 1,4-verknüpfter D-

Mannose besteht, von welchem einige Einheiten über 1,6-Verknüpfungen mit Galactoseeinheiten verknüpft sind. Für dieses Galactomannan sind Interaktionen mit Galectin-1 im Rahmen anti-metastasischer Untersuchungen beschrieben worden (Miller *et al.*, 2009). Damit bietet die Untersuchung der Interaktion von Galektinen mit galactosehaltigen Oligo- oder Polysacchariden die Möglichkeit, die Bindung von Galactanen an Galektine besser zu verstehen und in der Zukunft therapeutisch einsetzbare Galektin-Inhibitoren zu entwickeln.

## 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der erstmaligen Isolierung, Quantifizierung und Charakterisierung der Arabinogalactan-Proteine aus den Gymnospermen *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta*. Ein AGP aus *Encephalartos longifolius* sollte zusätzlich isoliert werden und in den Grundzügen charakterisiert werden. Nach der Isolierung mittels Yariv-Fällung sollten die quantitativen und qualitativen Zusammensetzungen der AGPs bestimmt werden.

Um eine nähere Charakterisierung zu ermöglichen, sollte der Uronsäuregehalt photometrisch gemessen werden und eine Uronsäurereduktion mit gleichzeitiger Deuterierung durchgeführt werden. Eine umfangreichere Charakterisierung des *Ginkgo biloba* AGPs, wurde mittels Durchführung verschiedener Partialhydrolysen ermöglicht. Zusätzlich sollten mit der Methode des Enzyme Linked Immunsorbent Assays (ELISA) die Reaktivität einzelner monoklonaler Antikörper getestet werden. Anhand dieser sowie den Ergebnissen aus der Bindungstypanalyse sollte letztendlich ein Strukturvorschlag für den Kohlenhydratanteil konzipiert werden. Die Proteinanalytik des Proteinanteils sollte mittels einer Elementaranalyse und einer Hydroxyprolinbestimmung erfolgen.

Der Aufbau von AGPs in Angiospermen ist bislang sehr gut untersucht worden. Weiterführende Analysen ermöglichten die Charakterisierung der AGPs aus einigen Moosen und Farne. Hier konnten einzigartige Strukturmerkmale gefunden werden. Da es bislang sehr wenig Untersuchungen der AGPs in Gymnospermen gibt und die Abgrenzung der AGs zu AGPs nicht eindeutig ist, soll diese Arbeit weitere vertiefte Einblicke in den strukturellen Aufbau der Gymnospermen-AGPs ermöglichen und damit weitere Rückschlüsse auf die Veränderung der AGPs im Laufe der Zellwandevolution ermöglichen.

Durch die Degradierung der AGPs zu Galactanen wurden potenzielle Liganden für humane Galektine hergestellt. Da Galektine im Tumorgeschehen involviert sind und schon vielfach über deren Interaktionen mit pflanzlichen Polysacchariden berichtet wurde, sollten kinetische Interaktionsstudien am BLI von Galactanen mit den humanen Galektinen-1 und -3 neue Einblicke in die Entwicklung neuer therapeutischer Galektin-Inhibitoren bieten. Zusätzlich wurde das Galektin-1 im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. E. Beitz, Abteilung Pharmazeutische Biologie der CAU zu Kiel, zellfrei exprimiert.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Verwendete Geräte und Materialien

#### 2.1.1. Allgemein verwendetes Material

Sofern nicht anders bezeichnet, wurden alle Glasgeräte von der Fa. Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland, verwendet.

Autotitrator:	Metrohm 719 S-Titrino, Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland
Gefriertrockner:	Christ Alpha 1-4 LSC/Beta 1-8 K, Fa. Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland; Vakuumpumpe: Chemie-HYBRID-Pumpe RC 6, Fa. Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland; Vakuum 1,030 mbar, Eiskondensator -54°C
Heizblock	Bioblock scientific, Code 92607, USA
Magnet-Heizrührer	RET basic, Fa. IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland Fühler: IKA ETS D5, Fa. IKA Labortechnik, Staufen /VT-4, Fa. VWR, Darmstadt
Mikroplate Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
pH-Meter	761 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland mit Elektrode: Mikroelektrode Blue- Line 16 pH, Fa. SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Photometer	Varian Cary 50 UV-Vis-Spectrophotometer, Fa. Varian, Kalifornien, USA
Pipetten	Eppendorf Research, Fa. Eppendorf, Hamburg mit Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polystyrolküvetten	Halb-Mikro-Küvette 1,6 ml aus PS (Einsatz ab 330 nm), Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rotationsverdampfer	RE-111, Fa. Büchi, Labortatoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz

Trockenschrank	Tv29, Fa. Memmert GmbH & Co. KG., Schwabach, Deutschland
Tubes	15 ml und 50 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vortexer	MS2 Minishaker, Fa. IKA, Labortechnik, Staufen, Deutschland & Vortex Genie 2, FA: Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waagen	Sartorius laboratory, Fa. Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland Sartorius genius, Fa. Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland Sartorius universal, Fa. Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL 1002, Fa. GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifugen	Heraeus™ Multifuge™ X3 Universalzentrifuge, Fa. Thermo Scientific, Waltham, US  US Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge, Fa. Thermo Scientific, Waltham, US

### 2.1.2. Allgemein verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten eine hochwertige analytische oder pharmazeutische Qualität.

### 2.1.3. Verwendetes Drogenmaterial

Für die Isolierung der HMFs, der AGPs sowie eines Arabinans wurden die Blätter (*Ginkgo*), die zerkleinerten oberirdischen Teile (*Ephedra*) bzw. die wedelförmigen Blätter ohne Mittelrippe (*Cycas*, *Encephalartos*) folgender Arten verwendet:

*Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae, gesammelt im Botanischen Garten der Pharmazeutischen Biologie, Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel.

*Ephedra distachya* L., Ephedraceae, gesammelt im Botanischen Garten der Pharmazeutischen Biologie, CAU.

*Cycas revoluta* Thunb., Cycadaceae, gesammelt im Botanischen Garten der CAU.

*Encephalartos longifolius* (Jacq.) Lehm., Zamiaceae, gesammelt im Botanischen Garten der CAU.

Alle Pflanzenteile wurden direkt nach der Ernte eingefroren und gefriergetrocknet.

## **2.2. Methoden der Polysaccharidanalytik**

### **2.2.1. Isolierung der wässrigen hochmolekularer Polysaccharid-Fractionen (HMF), der Yariv-Fällung (AGP) und eines Arabinans**

#### **2.2.1.1. Isolierung der wässrigen HMF**

Die gesamte Isolierungsvorgang wurde nach folgendem Schema durchgeführt (siehe Abbildung 10). Das pulverisierte und getrocknete Drogenmaterial von *Ginkgo biloba* (ca. 445 g), *Ephedra distachya* (ca. 90 g) und *Cycas revoluta* (ca. 300 g) wurde im Verhältnis 1:10 mit 70%igen (v/v) Aceton versetzt und für 2 h bewegungsmaziert. Mittels einer Vakuumpumpe (Filter: Rundfilter 3 hw, Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurden die Proben abgenutscht, getrocknet und dann erneut über Nacht für 20 h mit dem gleichen Verhältnis an 70%igen (v/v) Aceton geschüttelt. Nach erneutem Abnutschen wurden die Proben auf einem Filterpapier getrocknet. Das getrocknete Material wurde mit bidestilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 bei 4°C für 25 h auf einem Schüttler (SM, Fa. Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland) bewegungsmaziert. Um die Festbestandteile zu entfernen, wurden die Proben am nächsten Tag mit einer Tinkturenpresse (Hafico-Hochdruck (HP)-Tinkturenpresse, Fa. Fischer Maschinenfabrik GmbH, Neuss, Deutschland) kaltgepresst und der Extrakt in einem 1-Liter-Kolben aufgefangen. Die Extrakte wurden auf ca. 100 ml mittels Rotationsverdampfer eingeeengt und abgekühlt. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben bei 95°C für insgesamt 10 Minuten auf einem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren bei 4 122 g für 20 Minuten bei 4°C wurde der Extrakt in vorgelegten, gekühlten 99%igen Ethanol im Verhältnis 1:4 hinzugegeben, sodass die Endkonzentration des Ethanols 80% (v/v) betrug. Für eine möglichst vollständige Fällung der HMF wurden die Extrakte bei 4°C über Nacht gelagert. Um die gewonnene HMF zu isolieren, wurde mit der Zentrifuge wieder bei 4 122 g für 40 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand



wurde abdekandiert und der Restalkohol unter dem Abzug abgedampft. Sämtliche HMFs wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, gefriergetrocknet und ausgewogen.

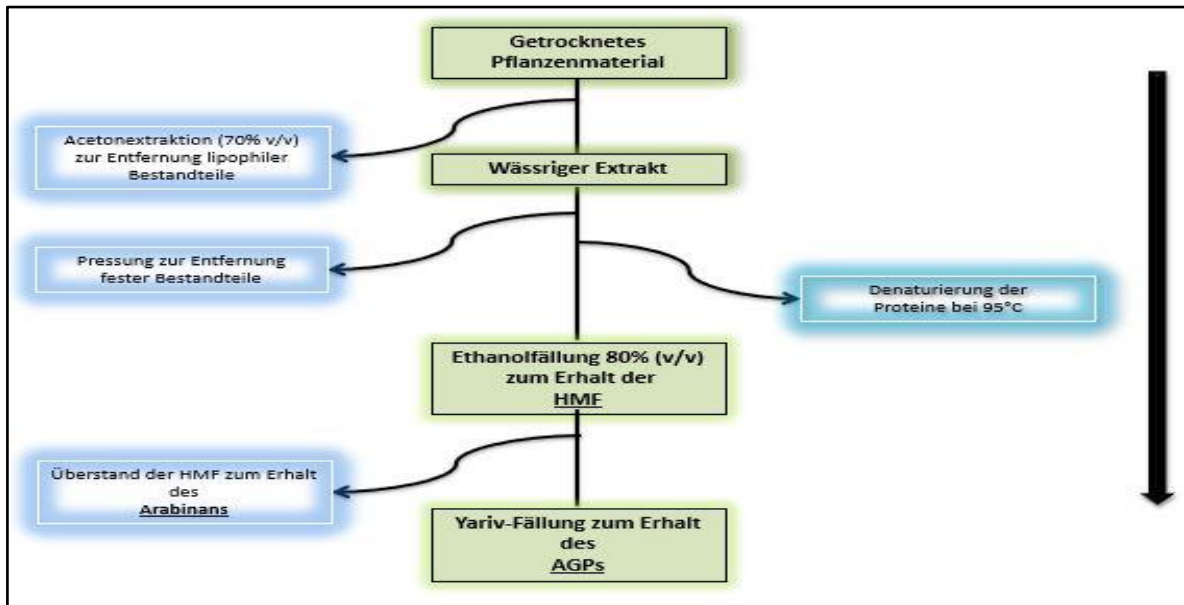


Abbildung 10: Durchgeführtes Extraktionsschema zum Erhalt der HMFs, der AGPs und des Arabinans

### 2.2.1.2. Isolierung weiterer Polysaccharide aus *Ginkgo biloba*

Die Isolierung weiterer Polysaccharide aus *Ginkgo biloba* wurde nach folgendem Schema durchgeführt (siehe Abbildung 11).

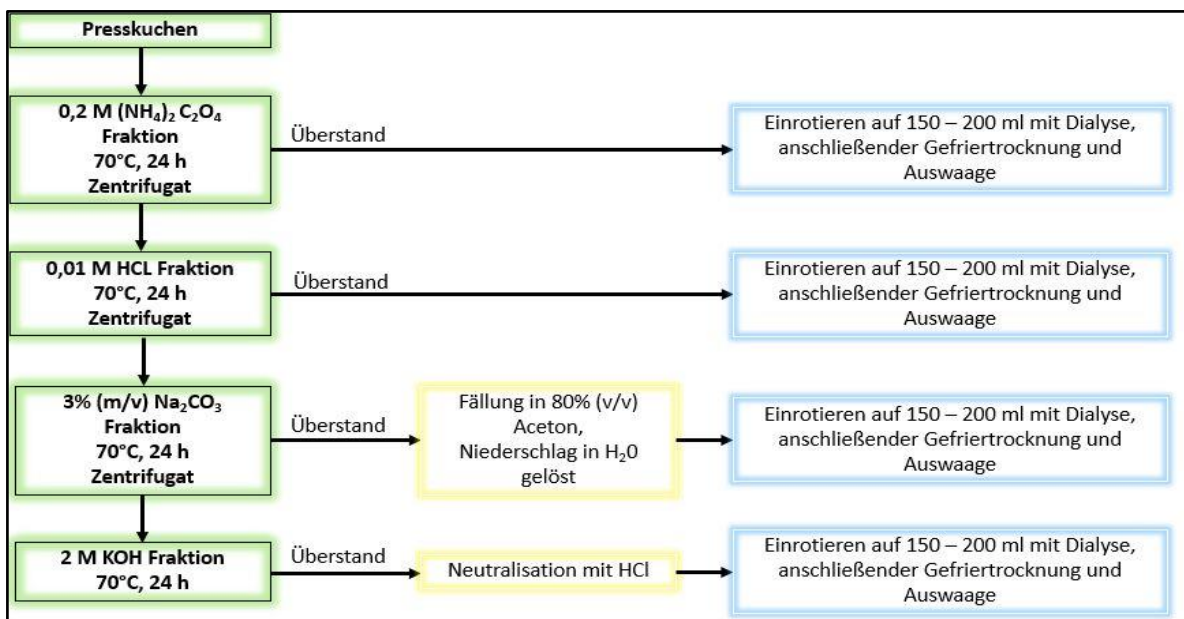


Abbildung 11: Durchgeführtes Extraktionsschema zur Gewinnung weiterer Polysaccharidfraktionen von *Ginkgo biloba*

Der bei der Isolierung nach der Wasserextraktion anfallende Presskuchen von *Ginkgo biloba* wurde für weitere Extraktionen (in Anlehnung nach O'Rourke *et al.*, 2015 und Raimundo *et al.*, 2016) verwendet, um weitere Polysaccharidfraktionen identifizieren zu können. Dazu wurden 10 g des gefriergetrockneten Presskuchens nach dem abgebildeten Schema extrahiert. Hierzu wurde nacheinander Extraktionsschritte mit 1 l 0,2 M Ammoniumoxalat (28,42 g Di-Ammoniumoxalat-Monohydrat in 1 l *Aqua bidest*), 0,01 M Salzsäure (1,6 ml 6 M HCl-Lösung in 1 l *Aqua bidest*), 3% Natriumcarbonat (81 g Natriumcarbonat-Decahydrat in 1 l *Aqua bidest* (3% (m/v)) und in 2 M Kaliumhydroxid (112,2 g KOH in 1 l *Aqua bidest*)

bei 70°C für 21 h unter Rühren bei Lichtausschluss durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde bei 4 122 g für 60 Minuten abzentrifugiert und der getrocknete Presskuchen für den jeweiligen weiteren Extraktionsschritt verwendet. Mit der Kaliumhydroxid- und der Natriumcarbonatlösung wurde anschließend gesondert verfahren. Erstere wurde mit 37% HCl neutralisiert und letztere mit einer 80%igen Acetonlösung über Nacht bei 4°C gefällt, wobei der abgenutzte Rückstand am nächsten Tag mit ca. 200 ml *Aqua dem.* erneut in Lösung gebracht wurde. Der jeweilig gewonnene wässrige Extrakt wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 150-200 ml einrotiert. Alle vier Lösungen wurden für 7 Tage dialysiert (Ausschlussgrenze: 6 000-8 000 Da, Fa Medicell International, London, England) und anschließend gefriergetrocknet.

### 2.2.1.3. Synthese des Yariv-Reagenzes

Die Synthese des Reagenzes  $\beta$ -D-Glc<sub>3</sub>-Yariv-Phenylglycosids ( $\beta$ GlcY) (D) (siehe Abbildung 12) wurde nach Yariv *et al.* (1962) durchgeführt. Hierzu wurde in einer eisgekühlten Lösung p-Aminophenyl- $\beta$ -D-glucose (A) in 0,5 M Salzsäure (HCl) mit Natriumnitrit zum Diazoniumsalz (B) umgesetzt und dieses anschließend in eine 0,02 M Phloroglucinlösung (C) hinzugegeben, welche ebenfalls eisgekühlt wurde. Durch das Zutropfen von 0,5 M Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung mittels Autotitrator konnte der pH-Wert konstant bei 9 gehalten werden. Das entstandene  $\beta$ GlcY wurde mit Methanol (Verhältnis 1:1 v/v) über Nacht bei

4°C gefällt und konnte danach bei 4 000 g für 20 Minuten zentrifugiert werden. Zur Aufreinigung wurde die Fällung in Wasser gelöst und nach dem gleichen Schema erneut gefällt. Die Trocknung erfolgte bei 40-45°C im Trockenschrank.

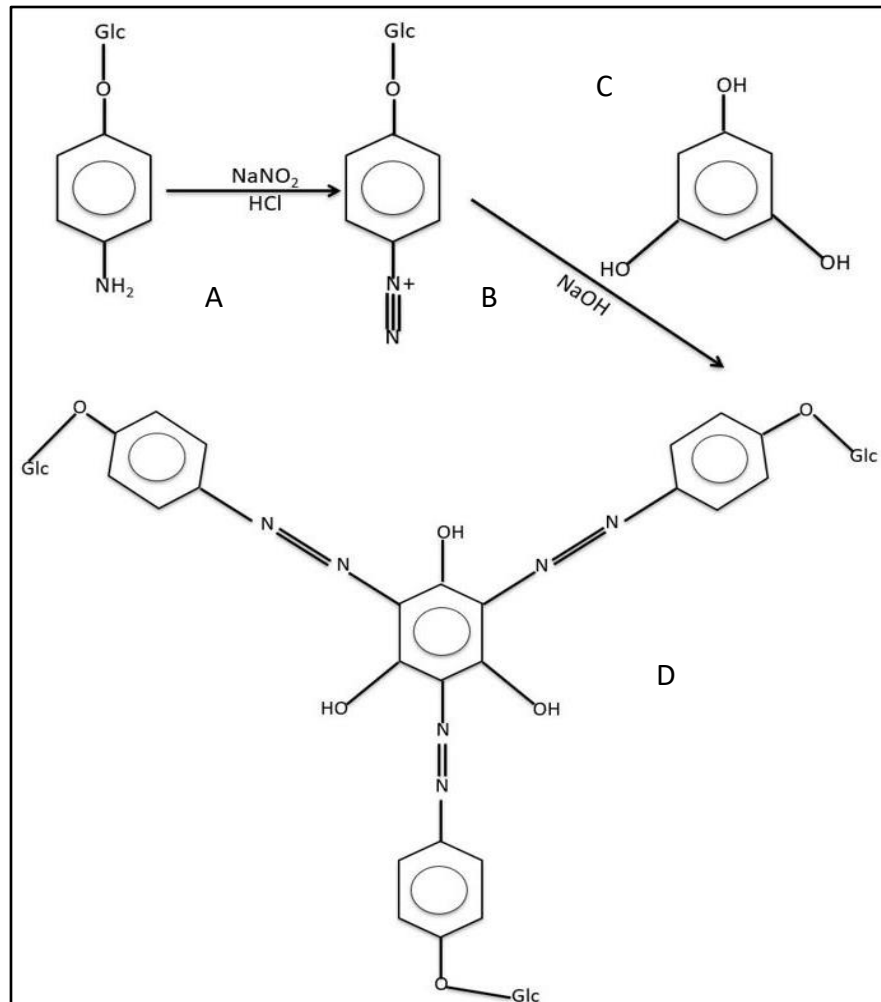


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Yariv-Synthese

#### 2.2.1.4. Isolierung der Yariv-Fällungen

Eine optimale Fällung von AGPs mit Yariv's Reagenz soll nach Literaturangaben bei einem Massenverhältnis von 1:1 erfolgen (Kreuger und van Holst, 1995). Um die AGP-Menge in der HMF abzuschätzen, wurden der Ara und Gal-Gehalt in der HMF quantifiziert und als theoretisch in der HMF vorhandenen AGP-Menge angenommen. Anhand des Arabinose- und Galactosegehaltes und der ermittelten Neutralzuckerausbeute konnten die benötigten Mengen der benötigten hochmolekularen Fraktion, des Yariv-Reagenzes, Natriumchlorid

(Endkonzentration nach dem Vereinen der Lösung: 0,15 mol) sowie *Aqua bidest* berechnet werden, um eine spezifische Fällung der AGPs zu ermöglichen.

Die Lösungen jeder Probe wurden mit den entsprechenden Einwaagen hergestellt und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurden die Lösungen der hochmolekularen Fraktionen bei 19 000 g für 20 Minuten bei 4°C mit der Multifuge abzentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Danach konnte die klare HMF-Lösung in die Lösung mit dem Yariv-Reagenz überführt werden, wonach die vereinte Lösung zum Ausfällen des AGPs über Nacht bei 4°C gelagert wurde. Um das AGP zu isolieren, wurde am nächsten Tag bei 19 000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die Fällung wieder in Lösung gebracht. Der Überstand der Fällungsreaktion wurde separat gesammelt. Sowohl die erneut gelöste Fällung als auch der Überstand wurden unter Rühren auf 50°C mit dem Magnetrührer erhitzt und mit soviel Natrium-Dithionit versetzt, bis die Lösung dauerhaft gelblich klar war (Zerstörung des Yariv's-Reagenzes). Um das Natrium-Dithionit, NaCl sowie die Yariv-Bruchstücke wieder zu entfernen, wurden beide Lösungen in Dialyseschläuche überführt (Ausschlussgrenze: 12 000-14 000 Dalton, Fa. Medicell International LTD, London, England). Das Dialysewasser wurde täglich gewechselt, wobei die Dialysedauer 5 Tage betrug. Die Retentate wurden bei -20°C eingefroren und für 3 Tage gefriergetrocknet.

#### **2.2.1.5. Isolierung eines Arabinans aus *Ephedra distachya***

Für die Fällung eines Arabinans wurde erneut das frische Material *Ephedra distachya* aus dem botanischen Garten des Pharmazeutischen Institutes der CAU gesammelt. Nach dem Einfrieren und Trocknen konnten 27 g für die Isolierung des Arabinans genutzt werden, die in Anlehnung nach Thude (2005) durchgeführt wurde. Nach Fällung der HMF (siehe Abbildung 10) wurde der ethanolhaltige Überstand abgenommen und bis zur Trockne am Rotationsverdampfer einrotiert. Um durch eine Fällung das Arabinans zu erhalten, wurde der Rückstand in 10 ml Wasser gelöst und in ein entsprechendes Volumen an gekühlten 99% (v/v) Ethanol gegeben, sodass die Endkonzentration der Lösung 90% (v/v) betrug. Um eine vollständige Fällung zu erhalten, wurde die Lösung bei 4°C über Nacht gelagert. Zur Isolierung wurde am nächsten Tag mit 4 122 g für 40 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Arabinan in ca. 10 ml *Aqua bidest* gelöst, einer vierzehntägigen

Dialyse unterzogen (Ausschlussgrenze: 12 000-14 000 Dalton, Fa. Medicell International LTD, London, England) und danach gefriergetrocknet.

### 2.2.2. Geldiffusionstest

Um eine makroskopische Reaktion der unterschiedlichen Proben mit dem  $\beta$ GlcY-Reagenz mittels Geldiffusionsplatten zu begutachten, wurden autoklavierte (121°C, 1 bar Wasserdampfüberdruck, 20 Minuten, Dampfsterilisator: VST 40/60 S, Fa. Zirbus Technology GmbH, Bad Grund, Deutschland) 1%ige Agarosegele in 10 mM Tris-HCL-Puffer (pH 7,3) mit 0,9% NaCl und 1 mM Calciumchlorid hergestellt und in sterile Kunststoff-Petrischalen (Petrischale 92,16 mm mit Nocken, Ø 9 cm, Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) ausgegossen. Nach dem Erhärten der Gele wurde für das  $\beta$ GlcY-Reagenz ein zentrales Loch (Ø 4mm) ausgestanzt und 20 µl einer wässrigen Yariv-Reagenz-Lösung (1 mg/ml) in die Kavität überführt. Für die Proben wurden um diese Kavität 4 weitere Löcher (Ø 4 mm) im gleichen Abstand ausgestanzt und in diese je 20 µl der wässrigen Proben unterschiedlicher Konzentrationen (HMF: 100 µl/ml, AGP: 10 mg/ml, Yariv-Überstand: 100 mg/ml) pipettiert. Als Positivprobe wurde jeweils das AGP (10 mg/ml) von *Echinacea purpurea* genutzt. Die behandelten Platten wurden 3 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und danach ausgewertet.

### 2.2.3. Analytische Strukturaufklärung der HMFs und der AGPs

Nachfolgend werden die Methoden dargestellt, welche zur gezielten Charakterisierung der HMFs und der AGPs genutzt worden sind.

#### 2.2.3.1. Neutralzuckeranalyse mit Acetylierung

Für eine Analytik der Neutralzuckerzusammensetzung von Polysacchariden wurde die Arbeitsvorschrift nach Blakeney *et al.* (1983) genutzt (siehe Abbildung 13). Die Derivatisierung der Neutralzucker lässt sich in die drei Hauptschritte, Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung, unterteilen. Im Anschluss konnten die Proben nach gaschromatischer Auftrennung qualitativ und quantitativ mittels FID analysiert werden.

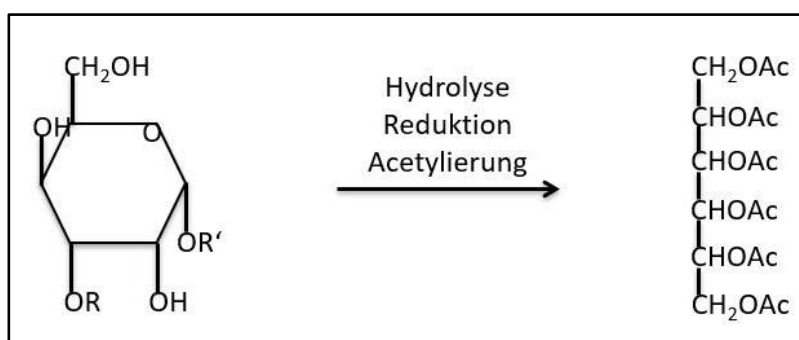


Abbildung 13: Reaktionsmechanismus der Acetylierungsreaktion nach

Blakeney *et al.*, 1983

Zunächst wurden pro Charge drei Ansätze der HMFs bzw. AGPs abgewogen. Die Menge war zwischen 0,3-5 mg zu wählen. Um die Hydrolyse der Polysaccharide in einzelne Monosaccharide zu erzielen, wurde jeder der drei Ansätze mit 1,0 ml Trifluoressigsäure behandelt. Zusätzlich wurde als interner Standard je 50 µl *myo*-Inositol hinzugegeben. Um eine verbesserte Spaltung der Polysaccharide zu erzielen, wurden die Ansätze 1 h bei 121°C inkubiert. Die Probenmischungen wurden jeweils in einen Spitzkolben überführt und die Säure im Anschluss bei 20 mbar und 40°C abrotiert. Jeder Ansatz wurde drei Mal mit 5 ml *Aqua bidest* versetzt und bis zur Trockne eingengt. Zur Alkalisierung der Proben wurden 200 µl Ammoniaklösung zugegeben. Eine Reduktion der Monosaccharide zu Alditolen wurde durch Zugabe von 1,0 ml NaBH<sub>4</sub> in DMSO ermöglicht, wonach vorsichtig geschüttelt wurde. Die Proben wurden 90 Minuten bei 40°C im Trockenschrank inkubiert. Um das Natriumborhydrid zu entfernen, wurden 100 µl konzentrierte Essigsäure hinzugeben, wobei Wasserstoff entwich. Nach der Zugabe von 200 µl Methylimidazol als Katalysator wurden 2 ml über Molekularsieb getrocknetes Acetanhydrid (4 A, Typ 514, Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) hinzugeben und dann 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 10 ml *Aqua bidest* wurde die Acetylierung durch die Zugabe von 1,0 ml 0,1 M Schwefelsäure unterbrochen. Mit 1,0 ml Dichlormethan ließen sich die acetylierten Alditole ausschütteln. Anzumerken ist, dass stabilere glykosidische Bindungen nicht gespalten werden können. Hier sind die Uronsäuren aufzuführen, welche nach der Hydrolyse als Disaccharid (Aldobiuronsäuren) vorliegen und daher chromatographisch nicht detektiert werden können.

Nach der Überführung in Vials konnten die Proben gaschromatographisch vermessen werden. Eine qualitative Auswertung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten der Monosaccharide mit den Retentionszeiten von Monosaccharidstandards. Zusätzlich ist eine Identifizierung über das Massenspektrum möglich. Für die quantitative Auswertung wurden die integrierten Peakflächen ins Verhältnis zur Peakfläche des internen Standards *myo*-Inositol gesetzt. Zusätzlich wurden Korrekturfaktoren mit in die Berechnung einbezogen, da der Flammenionisationsdetektor auf die Alditolacetate unterschiedlich anspricht.

#### **Gaschromatographie/Massenspektrometrie mit Flammenionisationsdetektion:**

Gaschromatograph:	7890B GC System mit FID-Detektor, Fa. Agilent, Santa Clara, USA
Injector:	Splitting-Verhältnis, Verhältnis: 1:30, 240°C
Säule:	Fused-Silica Kapillarsäule (WCOT-Kapillarsäule), Optima-225-0,25 µm (L 25 m, ID 0.25 mm), Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trägergas:	Stickstoff
Flussrate:	1,2 ml/Minute
Säulenofen:	230°C
Detektortemperatur:	Flammenionisationsdetektor 250°C
Massenspektroskopie:	5977B MSD, Agilent, Santa Clara, USA
Ionisationsmethode:	Elektronenstoß-Ionisation

#### **2.2.3.2. Kolorimetrische Bestimmung von Uronsäuren**

Die Uronsäuren werden nach Hydrolyse in einem Schwefelsäure-Tetraborat-Reagenz erhitzt, wobei sich anschließend ein stabiles Farbprodukt bildet, welches photometrisch vermessen werden kann (Franz und Köhler, 2013).

Für die photometrische Vermessung des Gesamturonsäuregehaltes wurde die Methode nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) durchgeführt. Hierzu wurden ca. 1 mg an HMF- und AGP-Probe sowie des Yarivüberstandes und ca. 0,9 mg des uronsäurereduzierten

AGPs von *Ginkgo biloba* mit 1 ml 4%iger Schwefelsäure (v/v) versetzt und für 1 h bei 121°C im Bioblock hydrolysiert. Nach der Zugabe von 1,2 ml Borax/Schwefelsäure wurden die Proben 5 Minuten im kochenden Wasser inkubiert und danach 10 Minuten im Eisbad wieder abgekühlt. Nach der Zugabe von 20 µl einer 3-Hydroxybiphenyl-Lösung (0,15% in Natronlauge 0,5% / Blindwert: 20 µl Natronlauge 0,15%) konnte nach 10 Minuten die Absorption bei 525 nm mit dem Photometer gemessen werden. Für die Gehaltsberechnung in den Proben wurde eine Kalibriergerade mit einem Gemisch von Glucuron- und Galacturonsäure (1:1 m/m) erstellt, da zwischen beiden Uronsäuren kolorimetrisch nicht unterschieden werden kann.

### 2.2.3.3. Reduktion der Uronsäuren

Mittels Methode nach Taylor und Conrad (1972) werden durch Reduktion der freien Carboxylgruppen mit Natriumborodeuterid die entsprechenden Monosaccharide zu ihren korrespondierenden zweifach deuterierten Neutralzuckern. Damit können Uronsäuren einer Bindungstypanalyse zugänglich gemacht werden (siehe Abbildung 14).

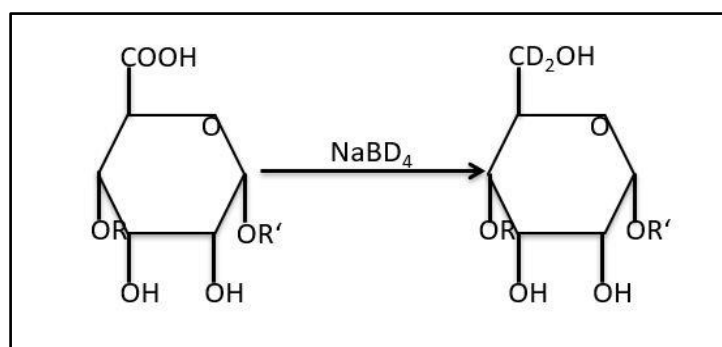


Abbildung 14: Reaktionsschema der Uronsäurereduktion nach

Taylor und Conrad, 1972

Hierfür wurden ca. 15-20 mg der AGP-Proben eingewogen und in 20 ml *Aqua dem.* gelöst. Um eine Schaumbildung zu vermindern, wurden je Probe 2 Tropfen Octanol hinzugegeben. Die Zugabe von 216 mg N-Cyclohexyl-N-[2-N-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat ermöglichte eine Reaktion der Carbonsäure zu einem Acylisoharnstoff,



wodurch deren Reaktivität erhöht wurde. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einem Autotitrator für 4 h mittels 0,01 molarer Salzsäure konstant auf 4,75 gehalten. Die anschließende Reduktion der Uronsäuren erfolgte durch die tropfenweise Zugabe von 4 ml 1 M, 5 ml 2 ml und 5 ml 4 M Natriumborodeuterid Lösung. Parallel hierzu wurde der Alkalisierung der Lösung mit einer 2 M Salzsäurelösung entgegengewirkt, wobei der pH-Wert mittels Autotitrator bei 7,0 gehalten wurde. Nach der Zugabe von Natriumborodeuterid wurde der pH-Wert der Lösung mit 5 Tropfen Eisessig auf exakt 6,5 eingestellt, die Lösung in Dialyseschläuche (Ausschlussgrenze: 6 000-8 000, Fa. Medicell International, London, England) überführt und 3 Tage gegen *Aqua dem.* dialysiert. Danach konnte die Lösung gefriergetrocknet werden.

#### **2.2.3.4. Alkalische-Hydrolyse**

Durch die alkalische Hydrolyse wurde der Proteinanteil des AGPs zerstört, sodass die inaktiven Oligo- und Polysaccharide mit nur einer für die Bindung verantwortlichen Aminosäure isoliert werden konnten. Die Durchführung erfolgte nach Volk *et al.* (2007). Für den Versuch wurden insgesamt ca. 85 mg an AGP eingewogen und in 3 ml 0,44 N NaOH für 18 Stunden bei 105°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Probe mit 0,5 M HCL neutralisiert und in Ethanol (Endkonzentration 80% (v/v)) über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde die Fällung bei 19000 g für 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und zweimal mit 4 ml 80%igem (v/v) Ethanol gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift erneut zentrifugiert wurde. Das Zentrifugat wurde in 3 ml Wasser gelöst, eingefroren und schließlich gefriergetrocknet. Im Anschluss wurden nach der Auswaage ca. 30 mg für die milde Säurehydrolyse eingesetzt. Um zusätzlich den Hydroxyprolinegehalt zu bestimmen, wurde die AGP-Probe nach der alkalischen Hydrolyse ebenfalls einer Hydroxyprolinbestimmung unterzogen (2.2.4.9.).

#### **2.2.3.5. Oxalsäure-Partialhydrolyse**

Die Spaltung labiler glykosidischer Bindungen durch saure Hydrolyse wurde nach der Methode von Gleeson und Clarke (1979) durchgeführt. Hierfür wurden ca. 40 mg an nativem AGP und ca. 2,6 mg des alkalisch hydrolysierten AGP eingesetzt und in einer Konzentration

von 3 ml/20 mg Probe in 12,5 mM Oxalsäure gelöst. Nach dem Erhitzen für 5 h bei 100°C im Heizblock und anschließendem Abkühlen wurde das Hydrolysat für 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Für die Fällung des partialhydrolysierten Polysaccharids wurde der Überstand in einer so definierten Menge an vorgelegtem kalten 99%igen Ethanol gegossen, dass eine Endkonzentration von 80% (v/v) erreicht wurde, welche dann über Nacht bei 4°C stehengelassen wurde. Die Fällung wurde bei 19000 g für 10 Minuten bei 6°C zentrifugiert und anschließend mit 4 ml 80%igen (v/v) Ethanol gewaschen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Überstände und Waschlösungen wurden vereinigt, zur Trockne einrotiert, in 1 ml *Aqua bidest* aufgenommen und gefriertrocknet.

#### **2.2.3.6. Milde TFA-Partialhydrolyse**

Für eine weitere milde Säurehydrolyse, die eine Abspaltung der labilen furanosidischen Arabinosen ermöglicht, wurden ca. 30 mg an alkalisch hydrolysiertem AGP mit 5 ml 0,2 molarer TFA versetzt. Die Probe wurde für 2 h bei 80°C in einem Wheaton-Gefäß auf dem Heizblock hydrolysiert. Durch die Zugabe von 5 ml *Aqua bidest* wurde die Reaktion abgebrochen und die Säure im Anschluss abrotiert, wobei zwei Mal mit je 5 ml *Aqua bidest* gewaschen wurde. Es folgte eine Fällung in 80% (v/v) Ethanol bei 4°C über Nacht, wofür die Probe in 20 ml *Aqua bidest* gelöst wurde und in 80 ml 99%igen Ethanol gegeben wurde. Die Fällung wurde für bei 19 000 g 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert sowie währenddessen zwei Mal mit 4 ml 80%igen Ethanol gewaschen. Das Zentrifugat wurde in 3 ml *Aqua bidest* gelöst, eingefroren und gefriergetrocknet. Die Durchführung erfolgte nach Happ (2019).

#### **2.2.3.7. Perjodatabbau**

Bei der sogenannten Smith-Degradation (hier nach Usov *et al.*, 1997; Furneux und Stevenson, 1990) werden die Polysaccharide gezielt strukturabhängig fragmentiert. Zunächst erfolgt durch die Zugabe von Na-Perjodat eine Oxidation vicinaler OH-Gruppen. Zusätzlich wird die Bindung zwischen den hydroxylgruppentragenden Kohlenstoffatomen gespalten. Es folgte eine Reduktion der Carbonylgruppen zu primären Alkoholen mit anschließender

saurer Hydrolyse. Es wurden ca. 20 mg an AGP in 10 ml 0,1 molarer Na-Perjodatlösung gelöst und 48 Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit gerührt. Durch die anschließende Zugabe von 195 µl Ethylenglykol wurde die Reaktion bei 3 h Rühren bei Raumtemperatur unterbrochen. Die entstandenen Carbonylgruppen wurden mit 100 mg Natriumborhydrid unter Rühren für 20 h zu primären Alkoholgruppen reduziert. Nach Neutralisation mit Eisessig wurde für 3 Tage bei 4°C dialysiert (Ausschlussgrenze: 1 000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc., Deutschland) und die Proben anschließend eingefroren und gefriergetrocknet. Durch eine anschließende 15 stündige milde Säurehydrolyse mit 1 ml 0,5 molarer TFA wurden die Zuckerreste abgespalten, ohne dass intakte glykosidische Bindungen angegriffen wurden. Die Säure wurde schließlich abrotiert und die Probe gefriergetrocknet.

#### **2.2.3.8. Bindungstypanalyse**

Um eine Charakterisierung des Verzweigungsmusters der Monosaccharide der AGPs bzw. der partialhydrolysierten AGPs zu ermöglichen, wurde die Methylierungsanalyse nach Harris *et al.* (1984) durchgeführt (siehe Abbildung 15). Nach der Deprotonierung durch Dimethylsulfinyl-Kalium wurden die aktivierten freien OH-Gruppen der Polysaccharide durch Iodmethan in Methylether überführt. Um die Reaktion möglichst vollständig ablaufen zu lassen, musste unter vollkommenen Wasserausschluss gearbeitet werden, wofür alle Materialien und Reagenzien zuvor getrocknet wurden. Um eine vollständigere Methylierung zu ermöglichen, wurde die Reaktion stufenweise durchgeführt. Nach Hydrolyse der Polysaccharide und Reduktion durch Natriumborhydrid entstanden teilmethylierte, offenkettige Alditolacetate. Diese wurden durch die anschließende Zugabe von Acetanhydrid acetyliert, wodurch partiell methylierte Alditolacetate (PMAAs) entstanden, deren Struktur eine Aufklärung über den Bindungstyp und Ringtyp gab, welche über eine gaschromatographische Auftrennung mit anschließender Massenspektroskopie ermittelt werden konnten. Anhand der ermittelten relativen Retentionszeiten im Vergleich zu Inositol sowie über einen Vergleich der Massenspektren mit einer arbeitskreisinternen Spektrenbibliothek konnte die Identität der PMAAs bestimmt werden. Die quantitative Bestimmung wurde über die Peak-

flächen des FID-Spektrums ermöglicht. Da der FID-Detektor ein unterschiedliches Ansprechen auf die PMAAS zeigt, wurde dieses durch die Verwendung von Faktoren ausgeglichen (Sweet *et al.*, 1975).

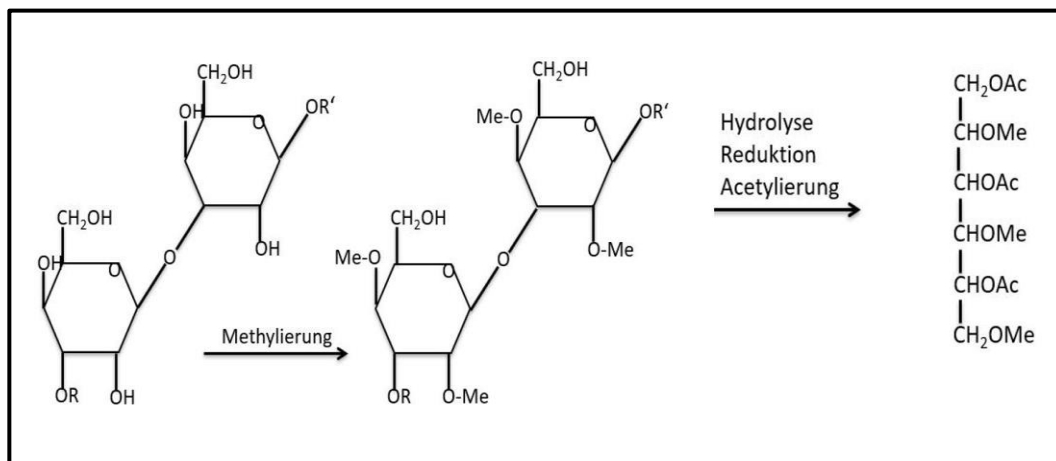


Abbildung 15: Reaktionsschema der Methylierungsreaktion nach Harris *et al.*, 1984

Für die Methylierung der Proben wurde in ein Reagenzglas mit Ansatz ca. 1000 mg einer öligen Kaliumhydrid-Suspension eingewogen. Nach dem Begasen mit Stickstoff wurde mit 20 ml Hexan gewaschen. Das vollkommen getrocknete Kaliumhydrid (KH) wurde abgewogen, im Eisbad gekühlt und in einer Menge 13 ml trockenes DMSO/Gramm KH gelöst. Um das KH vollständig zu lösen, wurde für 30 Minuten mit einem Magnetrührer gerührt.

Ca. 1 bis 5 mg der AGP-Proben wurden in ein Reagenzglas mit einem Ansatz eingewogen, mit Stickstoff begast und jede Probe in 200 µl DMSO gelöst. Die Zugabe der Dimsyl-Lösung und des Iodmethans erfolge nach folgendem Pipettierschema:

- |                                   |                       |
|-----------------------------------|-----------------------|
| 1.) 20 µl Dimsyl-Lösung           | 10 Minuten Inkubation |
| 2.) 5 µl eisgekühltes Iodmethan   | 5 Minuten Inkubation  |
| 3.) 60 µl Dimsyl-Lösung           | 10 Minuten Inkubation |
| 4.) 15 µl eisgekühltes Iodmethan  | 5 Minuten Inkubation  |
| 5.) 100 µl Dimsyl-Lösung          | 10 Minuten Inkubation |
| 6.) 80 µl eisgekühltes Iodmethan  | 5 Minuten Inkubation  |
| 7.) 200 µl Dimsyl-Lösung          | 30 Minuten Inkubation |
| 8.) 150 µl eisgekühltes Iodmethan | 30 Minuten Inkubation |

Zu den methylierten Proben wurde in Zentrifugenreagenzgläsern eine Mischung aus 2 ml Chloroform und 1 ml Methanol gegeben. Nach weiterer Zugabe von 2 ml *Aqua dem.* wurden die Proben für bei 2 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und die obere wässrige Phase im Anschluss verworfen, ohne die Interphase zu verletzen. Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt, wobei anschließend zur lipophilen Phase 2,2 ml 2,2-Dimethoxypropan zur restlichen Wasserbindung, 20 µl Eisessig und Siedeperlen hinzugegeben und auf 90°C im Bioblock erwärmt wurde. Das restliche Lösungsmittel wurde unter Stickstoff abgeblasen und die Proben anschließend bei -20°C tiefgekühlt. Die am Vortag eingefrorenen Proben wurden mit 50 µl Inositol sowie 1,0 ml 2 M Trifluoressigsäure versetzt und im Bioblock für 1 h bei 121°C hydrolysiert. Nach Zugabe von 2 ml *Aqua bidest* wurden die Proben solange mit Stickstoff begast, bis die Probe trocken war. Zur Reduktion der methylierten Monosaccharide wurde 1 ml frisch hergestellte 0,5 M Natriumborhydrid-Lösung in 2 M Ammoniak hinzugegeben und für 1 h bei 60°C im Bioblock inkubiert. Durch die Zugabe von 0,5 ml Aceton wurde die Reaktion gestoppt, die Proben mithilfe von Pasteurpipetten in Spitzkolben überführt und unter Druckluft vorsichtig trocken abgeblasen. Die Proben wurden mit 200 µl Eisessig aufgenommen und mit 1,0 ml Ethylacetat, 3,0 ml Acetanhydrid und 100 µl Perchlorsäure als Katalysator hinzugefügt. Die Acetylierungszeit betrug 10 Minuten, wobei das restliche Acetanhydrid durch Zugabe von 10 ml *Aqua bidest* inaktiviert wurde. Dazu mussten 200 µl Methylimidazol als Katalysator hinzugefügt werden, wonach die Proben 10 Minuten stehen gelassen wurden. Diese konnten anschließend mit je 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt werden, wurden 5 Minuten stehen gelassen, wobei zuletzt die untere Dichlormethanphase abgenommen und in ein GC-Vial zur analytischen Vermessung überführt wurde.

#### **Standardprogramm der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie:**

Gaschromatograph:	7890B GC System mit FID-Detektor, Agilent, Santa Clara, USA
Säule:	Wall coated open tubular (WCOT)-Kapillarsäule (Fused Silica), Permabond OV-1701/ OPTIMA-1701-0,25 µm (L 25 m, ID 0,25 mm), Fa. Macherey & Nagel, Düren
Injektionsvolumen:	1 µl
Trärgas:	Helium

Flussrate:	1,0 ml/min
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Splitting-Verhältnis:	1:50
Injektortemperatur:	250°C
Temperaturprogramm:	Start: 2 Minuten bei 170°C, mit 1°C/Minute auf 210°C, 10 Minuten auf 250°C, isotherm Detektortemperatur: 240°C
Massenspektroskopie:	5977B MSD, Agilent, Santa Clara, USA
Ionisationsmethode:	Elektronenstoß-Ionisation

### **Modifiziertes Programm der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie:**

Gaschromatograph:	7890B GC System mit FID-Detektor, Agilent, Santa Clara, USA
Säule:	Wall coated open tubular (WCOT)-Kapillarsäule (Fused Silica), Permabond OV-1701/ OPTIMA-1701-0,25 µm (L 25 m, ID 0,25 mm), Fa. Macherey & Nagel, Düren
Injektionsvolumen:	1 µl
Trärgas:	Helium
Flussrate:	1,0 ml/min
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Splitting-Verhältnis:	1:10
Injektortemperatur:	250°C
Temperaturprogramm:	Start: 2 Minuten bei 170°C, mit 0,25°C/Minute auf 210°C, 10 Minuten auf 250°C, isotherm Detektortemperatur: 240°C
Massenspektroskopie:	5977B MSD, Agilent, Santa Clara, USA
Ionisationsmethode:	Elektronenstoß-Ionisation

### **2.2.3.9. Gehaltsbestimmung von Hydroxyprolin in den AGPs**

Das für die Farbreaktion eingesetzte Chloramin T bewirkt eine Oxidation des Hydroxyprolins unter Bildung von Pyrrol-2-carbonsäure und Pyrrol, welches als Reaktionspartner mit

dem Dimethylaminobenzaldehyd funktioniert. Vermutlich bilden sich Reaktionsprodukte, welche photometrisch vermessen werden können (Pindur, 1978). Die Hydroxyprolinbestimmung wurde nach der Vorschrift von Stegemann und Stalder (1967) durchgeführt. Hierfür wurden 3-7 mg an AGP-Probe abgewogen und in 0,3-0,7 ml 6 M HCl in einem Wheaton-Vial bei 110°C für 22 Stunden hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde bei 5 000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Zur Herstellung mehrerer Verdünnungen wurde der Überstand verwendet, wobei 80 µl jeder Probe mit 1920 µl *Aqua dem.* versetzt wurden. Für die Kalibriergeraden wurde eine Hydroxyprolinstammlösung hergestellt. Für die Stammlösung 1 wurden 3 mg Hydroxyprolin in 5 ml *Aqua dem.* gelöst. Von dieser Stammlösung 1 wurden 100 µl entnommen und in 10 ml *Aqua dem.* gelöst, um damit eine Stammlösung 2 mit einer Stammkonzentration von 6 µg/l herzustellen. Als Blindwert wurde die Reaktion mit 0,6 ml *Aqua dem.* durchgeführt. Von der Probenlösung/Stammlösung wurden 0,6 ml entnommen und in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 0,3 ml eines Oxidationsreagenzes (bestehend aus 210 mg Chloramin T gelöst in 15 ml Pufferlösung (2,6 g Citronensäure, 1,4 g NaOH, 7,8 g Natriumacetat, 25 ml 1-Propanol in 75 ml *Aqua dem.*)) versetzt, gevortext und 20 Minuten in Dunkelheit stehen gelassen. Danach wurden 0,3 ml eines Farbreagenzes (bestehend aus 1,5 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd, 5,25 ml 60% Perchlorsäure und 9,75 ml 2-Propanol) hinzugegeben. Die Eppendorfgefäße wurden danach bei 60°C für 15 Minuten in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben unter fließendem Wasser 3 Minuten abgekühlt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Messung erfolgte mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 558 nm.

#### 2.2.4. Elementaranalyse

Mit Hilfe der Elementaranalyse können Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel qualitativ und quantitativ bestimmt werden, wobei die Methode am Institut für anorganische Chemie der CAU mittels Verbrennungsanalytik durchgeführt wurde. Hierfür wurden 1-2 mg der Proben in Zinnkapseln eingewogen und in einem Ofen bei 990°C unter reinem Sauerstoff katalytisch verbrannt. Durch die Zersetzung entstanden Reaktionsgase, welche durch das Trägergas Helium über einen 500°C heißen Kupferkontakt geführt

wurden. Überschüssiger Sauerstoff wurden gebunden und die zuvor entstandenen Stickoxide reduziert. Kohlenstoffdioxid, Schwefeldioxid, Stickstoff und Wasser wurden gaschromatographisch aufgetrennt und konnten mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert werden. Anhand der zuvor eingewogenen Probenmenge konnten die Massenanteile der spezifischen Elemente errechnet werden. Der Blindwert wurde mit einer leeren Zinnkapsel ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte mit Sulfanilamid. Durch den ermittelten Stickstoffgehalt kann der Proteingehalt nach Kjeldahl (1883) mittels Faktor 6,25 berechnet werden.

### 2.2.5. Größenausschlusschromatographie mit Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS)

Um die absolute Molekulargröße und später das hydrodynamische Volumen der AGP-Proben zu bestimmen, wurde die Größenausschlusschromatographie mit Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS) genutzt. Durch die porösen Polymere der stationären Phase werden kleinere Moleküle aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsvolumina im Vergleich zu größeren Molekülen stärker zurückgehalten und eluieren entsprechend, wodurch sich deren Retentionszeit entsprechend verlängert. Für die Detektion wurde ein Brechungsindex-(RI-) welcher die Änderung des Brechungsindex des Elutionsmittels durch die darin enthaltenen Proben zur Konzentrationsbestimmung misst sowie ein Mehrwinkel-Lichtstreu-(Multi-Angle Laser Light Scattering-) Detektor verwendet, welcher das Streulicht bei mehreren Streuwinkeln zur Molmassenbestimmung nutzt. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Volumens wurden Pullulane aus dem Pilz *Aureobasidium pullulans* genutzt, welche durch ihre lineare Struktur nur ein ähnlich räumliches Strukturverhalten wie die in der Regel kugelförmigen AGPs aufweisen, allerdings mangels Alternativen verwendet werden mussten. Die eingesetzte Konzentration der Proben und der Pullulane betrug 2 mg/ml, welche einen Tag vor der Injektion zur Quellung stehen gelassen wurden und direkt vor dem Einspritzen noch einmal filtriert wurden.

SEC	Äkta pure 25, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire
Säule	Super 6 Increase 10/300 GL, GE Healthcare



Fließgeschwindigkeit	0,5 mL/min Injektionsvolumen 100 µl
RI Detektor	Optilab T-rEX, Wyatt Technology, Dernbach dn/dc 0,150 ml/g
MALLS-Detektor	DAWN <sup>®</sup> 8+, Wyatt Technology, Dernbach
Fließmittel	0,15 M NaCl, 0,05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Monohydrat 0,05 M, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Dihydrat pH 7, filtriert (0,1 µm Filter), entgast mittels Ultraschallbad, konstante Sterilisation mit UV-Lampe
Filter	Rotilabo <sup>®</sup> -Spitzenfilter, PVDF, Porengröße 0,22 µm, Roth GmbH+CO.KG, Karlsruhe
Software	ASTRA 7.1.2
Pullulane	Pullulan Kit P-82, Macherey-Nagel GmbH+CO.KG, Düren, Molekulargewichte: P-800 kDa, P-200 kDa, P-20 kDa

## **2.3. Bindung von AGPs an Antikörper und humane Galektine**

### **2.3.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Für die Interaktionsüberprüfung der AGP-Proben mit monoklonalen Antikörpern wurde ein indirekter ELISA durchgeführt (siehe Abbildung 16).

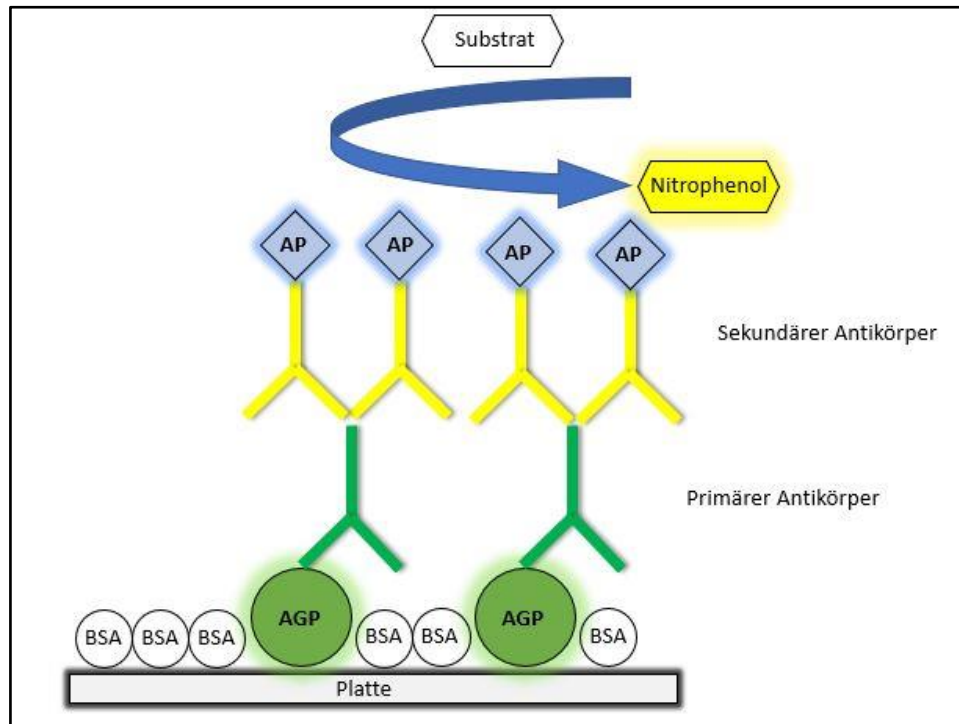


Abbildung 16: Schematische Abbildung des indirekten ELISAs

Zunächst wurden die 96-Well-Platten (Nunc-Immuno™ Plates MaxiSorp™ Surface, Fa. Thermo Scientific, Waltham, USA) mit 100 µl der AGP-Proben von *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya*, *Cycas revoluta* und *Echinacea purpurea* in wässrig definiert verdünnten Konzentrationen (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) beschichtet. Nach 3 tägiger Inkubation mit offenem Deckel im Trockenschrank bei 37,5°C wurden die Platten dreimal mit PBS-Puffer (2,84 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,54 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16,00 g NaCl, 1,00 g KCl ad 2 l *Aqua bidest*) gewaschen. Danach wurden die freien Bindungsstellen mit 200 µl einer 1%igen BSA Lösung in PBS abgesättigt und für 1 h bei 37,5°C inkubiert. Im Anschluss folgte ein dreimaliger Waschschrift, um überschüssiges BSA von der Platte zu waschen. Pro Kavität wurde nun je 100 µl eines primären Antikörpers mit jeweiliger Verdünnung in PBS hinzugegeben (siehe Tabelle 1). Nach der Zugabe wurde bei 37,5°C für 1 h inkubiert. Die Platten mussten erneut drei Mal gewaschen werden. 100 µl des sekundären mit alkalisch-Phosphatase konjugiertem AK (Maus-IgG für KM 1; sonst Ratten-IgG, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurden je 1:500 in PBS verdünnt und danach hinzugegeben. Nach erneuter Inkubation bei 37,5°C für 1 h wurde wieder drei Mal gewaschen. Pro Kavität wurden für die Farbreaktion 100 µl p-Nitrophenylphosphat

(Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA, Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland; 0,1 mg/ml in 0,2 M TBS) Substrat hinzugegeben. Die enzymatische Farbreaktion fand unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur statt und wurde in definierten Zeitabständen photometrisch mit dem ELISA-Reader (Tecan® Spectra Thermo, Fa. Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz) bei 405 nm vermessen.

Tabelle 1: Genutzte Antikörper für den indirekten ELISA und Darstellung ihrer Epitope

Anti-körper	Epitop	Ver-dün-nung	Quelle	Literatur-quelle
KM 1	(1→6)-β-D-Galp Einheiten in AGs Typ II	1:5	Pharm. Biologie, CAU Kiel	Classen <i>et al.</i> , 2004
LM 2	(1→6)-β-D-Galp Einheiten mit terminaler β-D- GlcAp im AGP	1:20	Plantprobes, Leeds, England	Ruprecht <i>et al.</i> , 2017
LM 5	[(1→4)-β-D-Gal] <sub>3</sub>	1:20	Plantprobes, Leeds, England	Moneo- Sanchez <i>et al.</i> , 2019
LM 6	(1,5)-α-L-Araf im Arabinan/AGP	1:20	Plantprobes, Leeds, England	Verhert- bruggen <i>et al.</i> , 2009
LM 26	(1,6-Galp)-Verknüpfung in (1,4-Galp)-β-D-Galactan	1:20	Plantprobes, Leeds, England	Torode <i>et al.</i> , 2018
JIM 13	AGP, β-D-GlcAp-(1→3)-α-D-GalAp- (1→2)-α-L-Rha?	1:20	Plantprobes, Leeds, England	Knox <i>et al.</i> , 1991; Yates <i>et al.</i> , 1996
MAC 207	AGP, β-D-GlcAp-(1→3)-α-D-GalAp- (1→2)-α-L-Rha?	1:20	Plantprobes, Leeds, England	Yates <i>et al.</i> , 1996; Pattahil <i>et al.</i> , 2010

### 2.3.2. Zellfreie Expression von Galektin-1

Im Rahmen einer Kooperation mit Folkhard Helmstetter und Lea Petersen aus dem Arbeitskreis der Pharmazeutisch-Medizinischen Chemie von Prof. Dr. E. Beitz, Pharmazeutisches Institut der CAU zu Kiel, sollte überprüft werden, ob Galektin-1 mittels zellfreier Expression hergestellt werden kann. Hierfür wurde der bakterielle Expressionsvektor pET-16b (T7-Promoter, Faktor-Xa-Schnittstelle, N-terminaler sechsfacher His-Tag, Ampicillin-Resistenz, Multiple-Cloning-Site) von der Firma GenScript, USA, bestellt, welcher das Gen des Galektins mit 423 Basenpaaren beinhaltet. Nachfolgend ist dieser Vektor beispielhaft von der Firma Novagen® dargestellt (siehe Abbildung 17). Die Punkte 2.3.2.1. bis 2.3.2.7. beschreiben die Vorbereitungen, welche für die anschließende zellfreie Expression (2.3.2.8.) nötig waren.

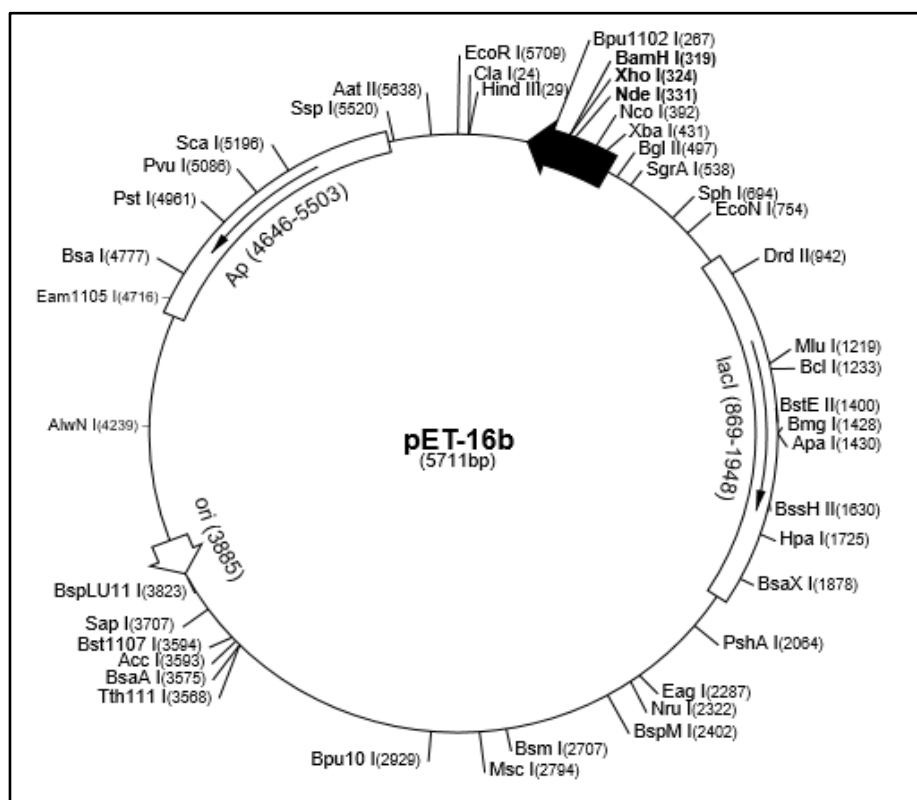


Abbildung 17: Eingesetzter pET-Vektor für die zellfreie Expression von Galektin-1

#### 2.3.2.1. Vorbereitung der Plasmid-DNA-Probe

Um die DNA am Boden des Eppendorfgefäßes zu sammeln, wurde bei 6 000 g für 1 Minute bei 4°C mit der Zentrifuge (Multifuge 1S-R Centrifuge, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland)

zentrifugiert. Anschließend wurden 20 µl sterilisiertes Wasser hinzugegeben. Nachdem 1 Minute gevortext wurde, konnte die Probe für die Schnelltransformation von *E. coli* verwendet werden.

#### **2.3.2.2. Schnelltransformation von *E. coli***

Bei der Schnelltransformation wurden 0,2 µl der Plasmid-DNA-Probe auf angetaute, chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Name: DH5α, Genotyp: F–  $\phi$ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1) gegeben und diese für insgesamt 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurden 40 µl dieser Zellen auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Kelvitron T®, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert.

#### **2.3.2.3. Vorkultur von *E. coli***

Für die Vorkultur wurde je eine Kolonie in je zwei 5 ml LB-Flüssigkultur (20 g LB-Medium (Lennox) auf 1 l *Aqua bidest*) gegeben. Um den Selektionsdruck zu erhöhen, wurde in die LB-Flüssigkultur Ampicillin (Amp) in einer Konzentration von 100 µg/ml hineingegeben. Die transformierten Zellen wurden danach für insgesamt 6 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### **2.3.2.4. Hauptkultur von *E. coli* Zellen**

In je zwei 1 l Kolben wurden 250 ml des LB-Mediums gefüllt und erneut Amp in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugegeben. Nach Überführung der gesamten Vorkultur wurden beide Ansätze bei 37°C für 18 h auf einem Flachbett-Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Die Ansätze wurden am nächsten Tag mit der Multifuge bei 4 000 g für 15 Minuten zentrifugiert und waren damit für die anschließende Maxipräparation zugänglich (2.3.2.6.).

### 2.3.2.5. Anlegen einer Dauerkultur

Für die Langzeitlagerung wurde zu 0,5 ml der *E. coli* Hauptkultur exakt 0,5 ml Glycerol (80%) hinzugegeben. Der Ansatz wurde vermischt und bei -20°C gelagert.

### 2.3.2.6. Isolierung der DNA

Für den Erhalt von größeren Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine Maxipräparation mit dem Nucleobond® PC500 (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Präparation wurde gemäß Herstelleranleitung durchgeführt. Die isolierte DNA wurde nach Lufttrocknung in 70 µl *Aqua bidest* gelöst.

### 2.3.2.7. Konzentrationsbestimmung der DNA

Für die photometrische Bestimmung wurden 2 µl der DNA mit 98 µl *Aqua bidest* in einer Quarzküvette verdünnt und im BioPhotometer Innova U535 (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) bei einer Absorption von 260 nm vermessen. Die Reinheit wurde über das Verhältnis von  $A_{260\text{ nm}}$  zu  $A_{280\text{ nm}}$  quantifiziert, da bei 280 nm auch verunreinigende Proteine mit aromatischen Aminosäuren erfasst werden. Nach Möglichkeit wurde ein Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 angestrebt.

### 2.3.2.8. Zellfreie Galektin-1 Proteinsynthese im präparativen Maßstab

Die zellfreie Expression ist ein gekoppeltes Transkriptions- und Translationssystem, welches es ermöglicht, aus einer *template*-DNA *in vitro* Proteine herzustellen. Für eine erfolgreiche Durchführung werden insbesondere ein geeignetes DNA-*template*, Nukleosidtriphosphate (NTPs), T7-RNA-Polymerase, tRNA und der *E. coli* S30-Extrakt, welcher die Ribosomen und Translationsfaktoren enthält, benötigt. Dieser Extrakt wurde ebenfalls in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Beitz hergestellt. Die einmalige Durchführung der Methode der zellfreien Expression mit dem *Continuous-Exchange-Cell-Free-System*

tem (CECF-System) im Rahmen eines präparativen Ansatzes ist überwiegend von Lea Petersen übernommen worden. Als Vorlage wurde die Methode von Schwarz und Junge *et al.* (2007) genutzt.

Sämtlich benötigte Stocks (siehe Tabelle 2) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Zunächst wurde ein Mastermix pipettiert, aus welchem nach Zugabe weiterer Bestandteile ein *feeding mixture* (FM) und ein *reaction mixture* (RM) hergestellt wurde. Der RM wurde mittels einer Kanüle und einer 1-ml-Spritze in den Zwischenraum einer Slide-A-Lyzer® Dialysekammer (Fa. Thermo Fisher Scientific, Ausschlussgrenze: 10 000 Da) überführt, welche anschließend ins Innere der in der Werkstatt (Pharmazeutisches Institut an der CAU zu Kiel) gebauten Kammer eingesetzt wurde (siehe Abbildung 18).

Tabelle 2: Eingesetzte Komponenten und deren Konzentrationen für die zellfreie Expression des Galektin-1

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Mastermix [μl]	FM-Mastermix [μl]	RM-Mastermix [μl]
NaN <sub>3</sub>	10%	90		
PEG8000	40%	900		
Kaliumacetat	4 000 mM	678,6		
Magnesiumacetat	1 000 mM	variabel		
HEPES/EDTA-Puffer	24x	660		
cCompleteTM	50x	360		
Folinsäure	10 mg/ml	180		
DTT	500 mM	72,0		
NTP-Mix	75x	240		
PEP	1 000 mM	360		
AcP	1 000 mM	360		
Aminosäure-Mix	4 mM	2 250	2 338	
RCWMDE	16,67 mM	1 080		
S30-Puffer	1x		5 950	
H <sub>2</sub> O	1x		1 763	151,90
Pyruvatkinase	10 mg/ml			8,00
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg/ml			17,50
T7-RNA-Polymerase	350 U/μl			42,86
Ribolock	40			7,50
Plasmid	variabel			variabel
S30-Extrakt	1x			350
Gesamtvolumen [μl]		variabel	17 000	1 000

Inhalt: NTP-Mix 75x: 90 mM ATP, 60 mM GTP,CTP,UTP; S30 Puffer: 10 mM Tris-Acetat, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM KCl; cComplete™ 50x: 1 Tablette cComplete™, 1 ml Aqua bidest; HEPES/EDTA-Puffer 24x: 2,4 M HEPES mit pH 8,0, 20 mM EDTA; Aminosäure-Mix 50x je 4 mM von: L-Arginin, L-Asparagin, L-Alanin, L-Aspartat, L-Glutamat, L-Glutamin, Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Lysin, L-Serin, L-Tryptophan, L-Valin, L-Cystein, L-Methionin, L-Tyrosin; RCWMDE je 16,67 mM von: L-Arginin, L-Cystein, L-Tryptophan, L-Methionin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure

Nach deren Verschluss wurde diese bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Der RM wurde mit einer Kanüle und einer 1 ml-Spritze aus der Dialysekammer entnommen und mit 1 ml Reinigungspuffer (bestehend aus 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH: 8) gespült. Beide Volumina mit einer Gesamtmenge von 2 ml wurden in einem 15 ml Falcon™ Zentrifugenröhrchen gesammelt. Hierbei wurde ein Ausfall einer weißen, nicht näher definierbaren Substanz beobachtet. 1 200 µl des RM wurden bei 13 000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 600 µl entnommen und das Präzipitat in der verbleibenden Menge von 600 µl resuspendiert. Die restlichen Mikroliter bildeten den unbehandelte RM. Im Anschluss folgte die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (2.3.2.9.).

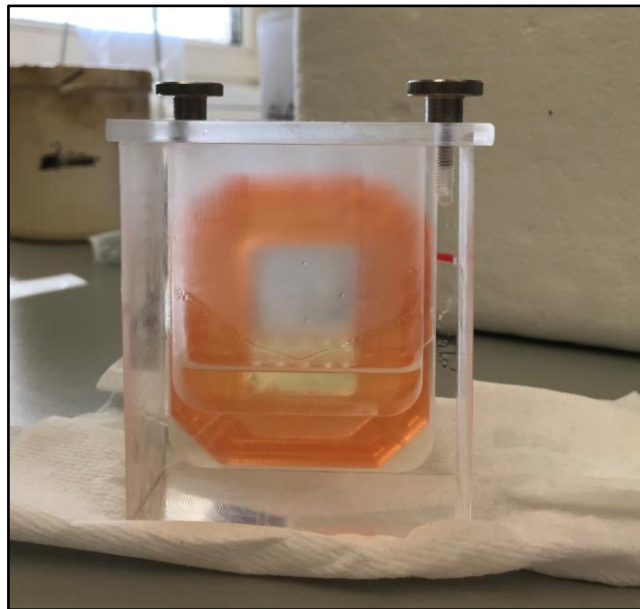


Abbildung 18: Dialysekammer für die zellfreie Expression von Galektin-1



Wie in Tabelle 1 aufgeführt, waren die zugegebenen Mengen von Magnesiumacetat und des Plasmids variabel. Der Magnesiumgehalt war dabei abhängig von der Qualität des gewonnenen S30-Extraktes und konnte je nach Extrakterstellung zwischen 10-18 mM  $Mg^{2+}$  variieren. Die Plasmidkonzentration war abhängig von der Ausbeute aus der Maxipräparation. Die Zielkonzentration betrug 0,023 mg/ml.

#### **2.3.2.9. Proteinreinigung über $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose-Affinitätschromatographie**

Für eine Aufreinigung des entstandenen Galektin-1 wurde die Affinität des enthaltenen Polyhistidin *Tags* zu  $Ni^{2+}$  genutzt. Drei Fritten (Wizard® SV Plus SV Minipreps DNA Purification System, Fa. Promega, Mannheim, Deutschland) wurden mit 100 µl einer  $Ni^{2+}$  NTA-Agarose Matrix Suspension (Qiagen, Hilden, Deutschland) beladen und diese danach zwei Mal mit je 1 ml Reinigungspuffer gewaschen. Die gewaschenen Matrixkügelchen wurden jeweils insgesamt 4 ml Reinigungspuffer aufgenommen und mit einem Probenansatz vereinigt. Jeder Ansatz wurde in einem 15 ml Falcon™ Zentrifugenröhrchen bei 4°C über Nacht im Kühler rotiert, wodurch das Protein über den poly-Histidin-*Tag* an die  $Ni^{2+}$  NTA binden konnte. Das gebundene Protein wurde am nächsten Tag erneut auf die Fritte gegeben. Nach Waschen der *beads* mit 1 000 µl 20 mM Imidazol-Reinigungspuffer wurden das Protein in den jeweiligen Ansätzen mit je 250 µl Imidazol Reinigungspuffer in aufsteigenden Konzentrationen (40 – 500 mM) eluiert. Jede Konzentrationsstufe wurde vor dem Eluieren für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die *beads* in 250 µl *Aqua bidest* aufgenommen.

#### **2.3.2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)**

Die SDS-Page ermöglicht mit Hilfe eines elektrischen Feldes die Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Hierfür wurde eine diskontinuierliche SDS-Page durchgeführt, bei welcher das Polyacrylamid aus einem Trenn- sowie einem Sammelgel bestand. Die Poren-

größe wird durch die Konzentration von Acrylamid definiert. N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) bewirkt eine freie Radikalbildung aus dem Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS), welches eine Polymerisation von Acrylamid zu Polyacrylamid bewirkt. Der Gelgießstand wurde mit 2/3 an 15%igen Trenngel (siehe Tabelle 3) befüllt und auf diese Schicht Isopropanol als Schutz vor dem Radikalfänger Sauerstoff gegossen. Nach Abschluss der Gelpolymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und bis zur maximalen Markierung mit dem hergestellten Sammelgel befüllt. Zur Bildung von Taschen wurde ein Probenkamm in das noch nicht vollständig ausgehärtete Gel aufgesteckt. Nach dem Aushärten konnte das Gel in eine Auftrennungsapparatur eingespannt werden, welche mit Kathodenpuffer (92 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl mit pH 8,2-8,6, 0,1% SDS) befüllt wurde.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-Page (Angabe für 2 Gele)

	<b>Trenngel 12,5%</b>	<b>Trenngel 15%</b>	<b>Sammelgel 5%</b>
<b><i>Aqua bidest</i></b>	5,25 ml	4,5 ml	2,4 ml
<b>Trenngelpuffer 4x (1,5 M Tris mit pH 8,8; 0,4% SDS)</b>	3 ml	3 ml	1 ml
<b>Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 40 (29:1))</b>	3,75 ml	4,5 ml	0,6 ml
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	6 µl
<b>APS 10%</b>	80 µl	80 µl	25 µl

Für die Denaturierung der Proteine wurden 11 µl der Probe mit 4 µl 4x SDS Ladepuffer (250 mM Tris-HCl mit pH 6,8, 40% Glycerol, 0,02% Bromphenolblau, 8% SDS, 400 mM DTT) vereint und für 30 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert. Als Proteinmarker wurde der PageRuler® Plus Prestained Protein, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte, verwendet. Je eine Menge von 15 µl wurden in die entsprechenden Taschen pipettiert, wonach eine Aufkonzentrierung der Proteine im Sammelgel für 15 Minuten bei 160 V durchgeführt wurde. Eine anschließende Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 200 V und wurde beendet, sobald der Bromphenol-Farbstoff aus dem Gel ausgetreten war. Trenn- und Sammelgel wurden per Hand voneinander getrennt und das Trenngel für eine anschließende Coomassie-Färbung (2.3.2.11.) genutzt.

### 2.3.2.11. Coomassie-Färbung

Das Trenngel wurde in ein Plastikgefäß überführt, mit Rotiphorese® Blau R-Lösung versetzt und für 1,5 Stunden auf einem Wippschüttler geschwenkt. Nachdem die Färbelösung verworfen wurde, erfolgte die Entfärbung des Hintergrunds mit einer Entfärberlösung (10% Eisessig, 30% Ethanol, 60% *Aqua bidest*) für insgesamt 1 Stunde auf dem Wippschüttler. Die Proteinfärbung erlaubte eine makroskopische Einschätzung über die Höhe der Konzentration des Galektin-1 in den unterschiedlichen Eluierungsfractionen.

### 2.3.2.12. Reinigung des Proteins

Für die weiterführende Behandlung des Proteins wurden die 80 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM Eluierungsstufen des Überstandes mit der 200 mM Eluierungsstufe des Präzipitates vereint. Von dem unbehandelten Ansatz wurden die Stufen 80 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM vereint. Um das Imidazol von dem Protein zu entfernen, wurden die beiden gewonnenen Ansätze nach Herstellervorschrift von GE Healthcare, Freiburg, mit den PD MidiTrap® G 25 Säulen aufgereinigt.

### 2.3.2.13. Proteinquantifizierung mittels Bradford-Reagenz

Für die Quantifizierung des Proteins wurden 798-792 µl *Aqua bidest* mit 2-8 µl der Proteinprobe sowie 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm mit dem Photometer (Bio-Photometer, Fa. Eppendorf-AG, Hamburg) vermessen. Als Blindwert wurde anstatt der Proteinlösung *Aqua bidest* genutzt.

### 2.3.2.14. Aufbewahrung des Galektins

Von den zwei gewonnenen Galektin-Ansätzen wurden jeweils 1000 µl mit 1000 µl Glycerin 80% versetzt und bei -20°C gelagert. Die restliche Menge wurde bei -70°C eingefroren.

### 2.3.2.15. Western Blot

Das Galektin-1 wurde nach einer SDS-Page unter Hilfe des Semidry-Elektrotransfers auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) überführt. Für die SDS-Page wurde ein 12,5%iges Trenngel genutzt (2.3.2.10.). Zuvor wurde die Membran für 60 Sekunden in Methanol aktiviert und 5 Minuten in Transferpuffer gelegt. Nachdem 3 Whatman®-Papiere auf die Anode gelegt wurden, folgten auf diese die PVDF-Membran, das Trenngel aus der SDS-Page und darauf erneut 3 Whatman®-Papiere. Der Transfer wurde bei 17 V für 1 Stunde durchgeführt.

Nachfolgend wurde die Membran für eine 1 h bei Raumtemperatur in 20 ml 3%igem MTBST (3% Milchpulver in 100 ml TBS 10x, 1 ml Tween 20, ad 1 l *Aqua bidest*) auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindestellen des Antikörpers zu blockieren. Der Puffer wurde verworfen und die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper *Anti-Penta-His-Mouse* (Verdünnung 1:5 000, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) in MTBST geschüttelt. Die Antikörperlösung wurde entfernt, dreimal 15 min lang unter Schütteln mit 10-20 ml TBST gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 Stunde mit 10 ml des sekundären Antikörpers *Peroxidase-Conjugatet-Anti-Mouse* (Verdünnung: 1:5 000 in MTBST, Fa. Jackson Immuno Research, Suffolk, England) versetzt und 1 Stunde auf dem Schüttler gelassen. Der sekundäre Antikörper wurde wie zuvor dreimal mit 10 ml MTBST für 15 Minuten gewaschen. Zuletzt wurde die Membran mit Clarity® Western ECL Substrate (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) benetzt und die Reaktion am Lumi Imager® F1 (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) detektiert.

## 2.3.3. Biotinylierung von Galektin-1 und -3 und deren kinetische Interaktionsstudien am BLI

### 2.3.3.1. Biotinylierung von Galektin-1 und -3

Aus einem EZ-Link® NHS-Biotin-PEG<sub>4</sub>-Stock (100 mM) wurde mittels einer Verdünnung von 1:1 000 mit sterilfiltriertem (Filtropur V50, 500 ml, 0,2 µm, Sarstedt, Newton, USA) PBS-Puffer (4,0 g NaCl, 0,72 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 g KCl, 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) eine Stammlösung mit

100 µM hergestellt. Die benötigte µl-Menge des Biotin-Reagenzes für das zellfrei exprimierte Galektin-1 und das gekaufte Galektin-3 (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde nach der Berechnungsvorlage von FortéBio biotinyliert.

$$\mu\text{l } 1 \text{ mM Biotin-Reagenz} = \frac{\text{Proteinkonzentration } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)}{\text{MW Protein kDa}} \times \text{MCR} \times \text{Proteinvolumen}$$

Die Konzentration des Galektin-1 lag bei 147 µg/ml und für Galektin-3 bei 1 000 µg/ml. Das MCR (Molar Coupling Ratio) wurde abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration nach Herstellervorgabe für Galektin-1 mit 1:5 und für Galektin-3 mit 1:1 angegeben. Die Umpufferung von Galektin-1 in PBS-Puffer wurde mittels einer Filtereinheit (Fa. Amicon® Ultra 4, 5 000 MWCO, Millipore, Carrigtwohill, Irland) durchgeführt. Diese wurde bei 8 000 g für 60 Minuten bei 4°C mit der Multifuge zentrifugiert, wobei immer nach 10 Minuten 2 ml des PBS-Puffers neu auf die Filtereinheit gegeben wurde. Die Zentrifugation wurde so lange fortgeführt, bis noch 100 µl der PBS-haltigen Proteinlösung in der Einheit vorhanden waren. Anschließend wurde eine erneute Umpufferung mit Entsalzungssäulen (Zeba® Spin Desalting Column, 0,5 ml, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach der Arbeitsvorschrift von Thermo Fisher durchgeführt. Nach Zugabe der errechneten Biotinmenge wurde die Biotinylierung für 2 Stunden auf Eis durchgeführt. Die anschließende Aufreinigung der Proben wurde nach der Arbeitsvorschrift von Thermo Fisher mit den wie zuvor genutzten Zeba®-Entsalzungssäulen durchgeführt.

### **2.3.3.2. Kinetische Interaktionsstudien von AGPs mit humanen Galektinen am BLI**

Für kinetische Echtzeitmessungen der AGP-Proben mit den biotinylierten Galektinen wurde die Methode der Bio-Layer-Interferometrie mittels Octet® RED96e (Pall FortéBio, Portsmouth, England) durchgeführt. Dieses Prinzip beruht auf der optischen Interferometrie, welches auf Lichtwellenüberlagerung von weißen Lichtwellen beruht. Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich wurde durch einen Sensor mit modifizierter Streptavidin-Oberfläche (Dip and Read® Streptavidin (SA) Biosensoren, Fa. Pall FortéBio, Portsmouth, England), ge-

sendet und an zwei Oberflächen zurückreflektiert. Die Reflexion findet an einer unveränderten sensorinternen Oberfläche und an einer durch Beladung veränderten äußeren Schicht statt. Die Länge der zweiten Reflexion ist hierbei abhängig von den Molekülen, welche an der Sensoroberfläche andocken, welche das spezifische Interferenzmuster verschieben und die Intensität des eingestrahlteten Lichtes verändern. Diese Verschiebung der Intensitäten der einzelnen Wellenlängen ist abhängig von der Größe und Dichte der Moleküllschicht auf dem Sensor und lässt sich zusätzlich bei dem gegenteiligen Effekt, der Dissoziation der Moleküle, beobachten (Wilson *et al.*, 2010). Mittels graphischer Auftragung der Verschiebung (nm) gegen die Zeit (Minuten) entsteht eine Assoziations-Dissoziationskurve, aus welcher mittels der *Octet System Data Analysis Software* (Version: 10.0.1.6.) die Geschwindigkeitskonstanten  $K_D$ ,  $K_a$  sowie  $K_d$  berechnet werden konnten.

Vor jeder Messung wurden die Sensoren für 30 Minuten in dem PBS-Puffer gelagert, um die überzogene Saccharoseschicht zu entfernen. Pro Kavität wurden immer 200 µl PBS-Puffer für die Waschprozesse, Galektin-1 (zellfrei) & -3 (je 10 µg/ml), Biocytin-Blockreagenz (10 µg/ml) sowie unterschiedliche AGP-Probenlösung in den unterschiedlichen Konzentrationen 1, 2, 5, 5, 10 und 20 µM pipettiert (siehe Abbildung 19). Diese Werte sind nach Vorlage von Zhang *et al.* (2016) entnommen. Die Sensoren tauchen nach Abschluss der Assoziation (Reihe 8) für die Dissoziation zurück in die Kavitäten der Reihe 7. Der Referenzsensor, welcher kein Galektin bindet, durchlief die gleiche Anordnung. Hierbei sollte überprüft werden, ob eine unspezifische Bindung der AGP-Probe am Sensor erfolgt. Die Konzentration der hierfür eingesetzten einzelnen AGP-Probe lag bei 10 µM (Abbildung Reihe G). Für jede Messung wurde zusätzlich ein Spritzschutz auf die Assayplatte aufgebracht. Der Schüttelprozess lag bei 1 000 rpm und die Gerätetemperatur bei konstanten 25°C.

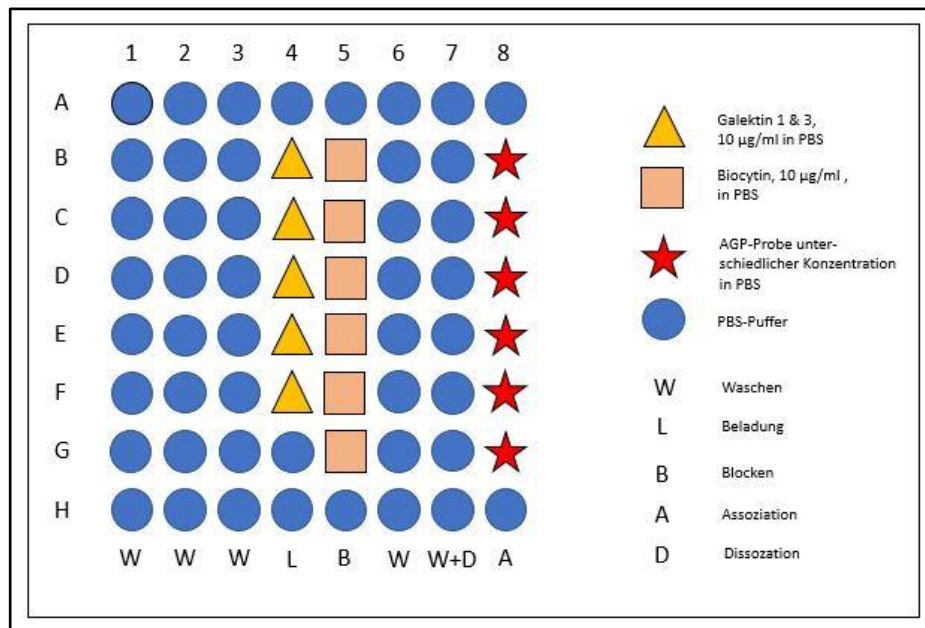


Abbildung 19: Anordnung des Versuchsaufbaus des Galektin-Assays am BLI

Die Grundlagen dieser BLI-Methode sind von Dr. Steffen Riehtmüller entwickelt worden. Für die Assay-Durchführung wurden insgesamt drei nacheinanderfolgende Waschschrte für insgesamt 2 400 Sekunden durchgeführt, um einen möglichen Basisliniendrift auszugleichen. Nach der Beladung der Sensoren mit den Galektinen (2 000 Sekunden) wurde ein kurzes Blocken unbesetzter Stellen durchgeführt (300 Sekunden). Nachdem erneut zwei Mal (2 600 Sekunden) gewaschen wurde, um ungebundene Substanzen von den Sensoren zu entfernen, wurde die Assoziation (800 Sekunden) mit einer anschließenden Dissoziation (1 200 Sekunden) durchgeführt. Eine Verkürzung der Assoziationszeit sollte die Möglichkeit einer geringeren unspezifischen Bindung bieten (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Darstellung des eingestellten Programms des BLI-Assays

Assay-Schritt	Assay-Bezeichnung	Probenkavität	Assay-Zeit
1	Waschen	1	600
2	Waschen	2	600
3	Basisline 1	3	1 200
4	Beladung	4	2 000
5	Blocken	5	300
6	Waschen	6	600
7	Basisline 2	7	2 000
8	Assoziation	8	800
9	Dissoziation	7	1 200

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Analytische Ergebnisse

##### 3.1.1. Ausbeuten der hochmolekularen Fraktionen, der Yariv-Fällungen, der Yariv-Überstände und des Arabinans

Nach der wässrigen Extraktion zum Erhalt der HMFs von *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya*, *Cycas revoluta* und *Encephalartos longifolius* mit anschließender Yariv-Fällung konnten folgende Mengen an HMFs, AGPs sowie des Arabinans von *Ephedra distachya* gewonnen werden (siehe Tabellen 5-8).

Tabelle 5: Auswaagen der HMF, des AGPs und des Yariv-Überstandes von *Ginkgo biloba*

Getrocknete Einwaage <i>Ginkgo biloba</i> [g]	Erntezeit	Probe	Auswaage [g]	% bezogen auf die eingesetzte Trockenein- waage
443,56	Oktober 2016	HMF	5,70	1,29
		AGP	0,23	0,05
		Yariv-Überstand	0,79	0,18

Da das AGP von *Ginkgo biloba* in dieser Arbeit den analytischen Schwerpunkt bilden sollte, wurde eine große Menge an getrocknetem Material eingesetzt. Die Ausbeute der HMF betrug 1,29%, die Ausbeute des AGPs betrug 0,05%.



Tabelle 6: Auswaagen der HMFs, der AGPs und der Yariv-Überstände von *Ephedra distachya*

<b>Getrocknete Einwaage <i>Ephedra distachya</i> [g]</b>	<b>Erntezeit</b>	<b>Probe</b>	<b>Auswaage [g]</b>	<b>% bezogen auf die eingesetzte Trockenein- waage</b>
54,83	Januar 2018	HMF 1	0,91	1,66
		AGP 1	0,03	0,05
		Yariv-Überstand	0,79	1,44
37,87	Oktober 2018	HMF 2	0,31	0,82
		AGP 2	0,006	0,02
		Yariv-Überstand	0,11	0,29
		Arabinan	0,002	0,005

Da der Arzneipflanzengarten des Pharmazeutischen Institutes der CAU nur eine begrenzte Menge an *Ephedra*-Pflanzenmaterial für die Isolierung bereitstellen konnte, mussten zwei Ernten zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen. Die Ausbeuten der HMFs und des AGPs zeigen in der Auswaage beider Chargen deutliche Unterschiede mit ungefähr halbierten Ausbeutemengen im Oktober. Eine Möglichkeit für die unterschiedlichen Auswaagen wäre der Erntezeitpunkt mit den unterschiedlichen Witterungsbedingungen. Es ist anzumerken, dass es im Jahr 2018 einen sehr heißen und langen Sommer von Mai bis Oktober gab. Die AGP-Ausbeute vom Januar ist mit der des *Ginkgo bilobas* vergleichbar. Zusätzlich konnte eine kleine Menge eines reinen Arabinans isoliert werden.

Tabelle 7: Auswaage der HMF, des AGPs und des Yariv-Überstandes von *Cycas revoluta*

<b>Getrocknete Einwaage <i>Cycas revoluta</i> [g]</b>	<b>Erntezeit</b>	<b>Probe</b>	<b>Auswaage [g]</b>	<b>% bezogen auf die eingesetzte Trockenein- waage</b>
298,27	August 2018	HMF	1,56	0,52
		AGP	0,08	0,03
		Yariv-Überstand	0,24	0,08

Die Ausbeute der HMF von *Cycas revoluta* war von allen Gymnospermproben mit 0,52% am geringsten. Die AGP-Ausbeute war mit 0,03% ähnlich gering wie die der zweiten *Ephedra distachya* Charge aus dem Oktober.

Tabelle 8: Auswaage der HMF, des AGPs und des Yariv-Überstandes von *Encephalartos longifolius*.

Die ermittelten Werte [\*] beziehen sich auf die eingesetzte HMF-Einwaage von nur 0,15 g

<b>Getrocknete Einwaage <i>Encephalartos longifolius</i> [g]</b>	<b>Erntezeit</b>	<b>Probe</b>	<b>Auswaage [g]</b>	<b>% bezogen auf die eingesetzte Trockenein- waage</b>
351,67	August 2018	HMF	3,55	1,01
		AGP	0,008*	0,05 theoretisch
		Yariv-Überstand	0,075*	0,51 theoretisch

Die Ausbeute der HMF von *Encephalartos longifolius* betrug 1,01%. Um zu überprüfen, ob die Fällung eines AGPs möglich ist, wurden nur 0,15 g der ausgewogenen HMF eingesetzt. Damit ergeben sich eine theoretische AGP-Gesamtauswaage von 0,19 g (0,05% bezogen auf die eingesetzte Trockeneinwaage) bzw. theoretische Yariv-Überstand-Auswaage von 1,81 g (0,51% bezogen auf die eingesetzte Trockeneinwaage).

Zusammenfassend liegt die Menge der HMFs der untersuchten Gymnospermen zwischen 0,52-1,66% und die Menge der AGPs zwischen 0,02-0,05%.

### 3.1.2. Geldiffusionstest

Mit Hilfe des Geldiffusionstestes kann ein erster Schnelltest auf ein mögliches Vorkommen von AGPs durchgeführt werden. Die HMF-Probe (100 mg/ml), welche AGP beinhaltet, bzw. das AGP (10 mg/ml) diffundieren durch das Gel und bilden eine Präzipitationslinie, sobald es auf das mittig eingesetzte  $\beta$ -GlcY-Reagenz (1 mg/ml) trifft (siehe Abbildung 20). Diese Reaktion ist abhängig von Verteilung der Probe im Gel sowie der AGP-Konzentration, was die unterschiedlichen Intensitäten der Linien begründen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei genutzten Gymnospermen-Proben ein AGP beinhalten. Als Positivprobe

wurde je Gel das AGP von *Echinacea purpurea* aus dem Arbeitskreis eingesetzt. Die eingesetzten Yariv-Überstände (100 mg/ml) zeigten keine Präzipitationslinien. Bei einer positiven Reaktion könnte der Yariv-Überstand noch verschlepptes AGP beinhalten.

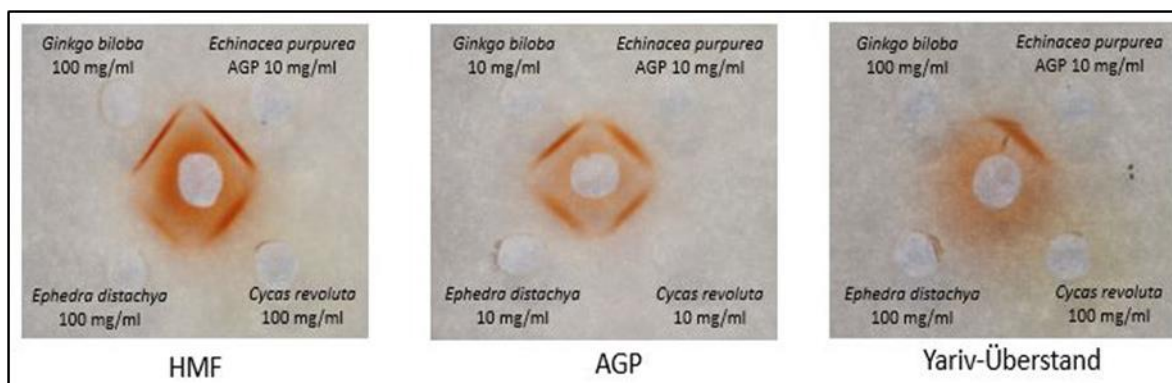


Abbildung 20: Auswertung des Geldiffusionstests

### 3.1.3. Charakterisierung des Kohlenhydratanteils

#### 3.1.3.1. Analyse der Neutralzucker

Die Neutralzuckeranalyse wurde nach der Methode von Blakeney *et al.* (1983) durchgeführt. Für die anschließende gaschromatographische Auswertung wurden folgende relative Retentionszeiten und Korrekturfaktoren genutzt (siehe Tabelle 9), welche aus der Datenbank des Arbeitskreises entnommen wurden. Die Alditolacetate werden nach steigender Hydrophilie eluiert, wobei zuletzt Inositol als interner Standard erscheint, welches den Korrekturfaktor 1 erhielt. Da für 3-O-Methyl-Rhamnose (3-O-Me-Rha) kein eigener Standard vorlag, wurde der Korrekturfaktor 1,57 der Rhamnose genutzt. Die Auswertung erfolgte anhand der Retentionszeit des Alditolacetates (Bartels *et al.*, 2017) und des Massenspektrums des PMAAs 1,2,4,5-Tetra-O-Acetyl-3-O-Methyl-Rhamnitol. In der Acetylierungsanalyse zeigt sich das Massenspektrum einer 1,2,4-Rhamnose. Die ermittelten Monosaccharidkonzentrationen mit weniger als 1% werden nachfolgend als „traces“ bezeichnet. Da Ribose in keinem der Proben gefunden wurde, wird dieser Zucker nicht weiter in den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen aufgeführt.

Tabelle 9: Genutzte Zuckerstandards mit den relativen Retentionszeiten und den eingesetzten Korrekturfaktoren

Monosaccharide	Relative Retentionszeit	Korrekturfaktoren
3-O-Methyl-Rhamnose	0,325	1,57
Rhamnose	0,348	1,57
Fucose	0,363	1,38
Ribose	0,397	1,69
Arabinose	0,423	1,31
Xylose	0,494	1,53
Mannose	0,842	1,19
Galactose	0,910	1,19
Glucose	0,967	1,31

Nachfolgend ist das Gaschromatogramm der Zuckerstandards dargestellt (siehe Abbildung 21).

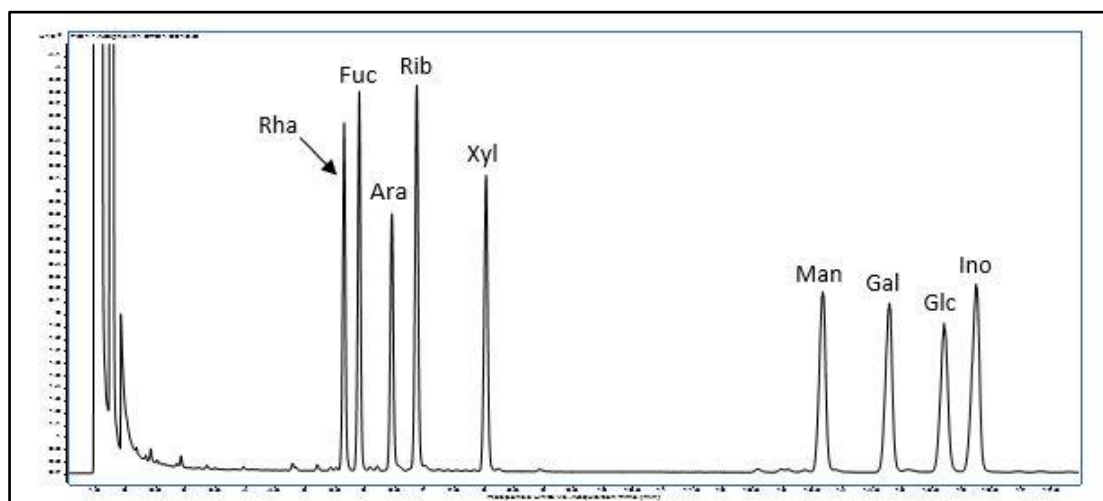


Abbildung 21: Gaschromatogramm der Zuckerstandards

### 3.1.3.2. Neutralzuckeranalyse der HMFs

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Neutralzuckeranalyse, die Ausbeuten und das Verhältnis von Ara/Gal der HMF-Proben dargestellt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Neutralzuckerzusammensetzungen (mol/mol%) der vier Gymnospermen-HMFs

<b>Mono-saccharide</b>	<b><i>Ginkgo biloba</i> HMF in % (mol/mol) n=3</b>	<b><i>Ephedra distachya</i> HMF 1 in % (mol/mol) n=3</b>	<b><i>Ephedra distachya</i> HMF 2 in % (mol/mol) n=1</b>	<b><i>Cycas revoluta</i> HMF in % (mol/mol) n=3</b>	<b><i>Encephalartos longifolius</i> HMF in % (mol/mol) n=1</b>
<b>3-O-Me-Rha</b>	1,5 ± 1,1	3,5 ± 0,2	2,0	-	8,1
<b>Rha</b>	18,5 ± 1,5	12,7 ± 0,3	14,6	5,5 ± 1,1	6,8
<b>Fuc</b>	-	1,0 ± 0,7	1,5	1,1 ± 1,6	traces
<b>Ara</b>	17,0 ± 1,7	45,8 ± 2,0	39,9	29,1 ± 3,2	43,2
<b>Xyl</b>	3,2 ± 0,5	11,5 ± 1,3	10,0	12,0 ± 1,7	11,1
<b>Man</b>	20,3 ± 1,0	3,2 ± 0,7	5,6	11,3 ± 1,2	3,7
<b>Gal</b>	15,8 ± 0,4	16,0 ± 2,3	11,0	19,6 ± 3,0	10,6
<b>Glc</b>	23,7 ± 3,4	6,3 ± 0,8	15,4	21,4 ± 0,9	15,8
<b>Ausbeute in % (m/m)</b>	17,0 ± 0,1	27,3 ± 1,3	34,2	17,7 ± 2,0	32,2
<b>Ara/Gal in % (mol)</b>	1:0,9	1:0,4	1:0,3	1:0,7	1:0,3

Die Ausbeuten der drei HMFs liegen zwischen 17,0% und 34,2%. In der HMF von *Ginkgo biloba* liegen Arabinose (17,0%) und Galactose (15,8%) im Verhältnis 1:0,9 vor, welches für ein Vorkommen von einem AGP typisch ist. Der Glucosegehalt beträgt 23,7%, welches für eine verstärkte Einlagerung von Stärkemolekülen spricht.

Weiterhin kommen auffällig hohe Mengen an Mannose (20,3%) und Rhamnose (18,5%) vor, welches ein Vorkommen von sauren Pektinen aus der Zellwand bzw. Glucomannanen wahrscheinlich macht. Weiterhin zeigt sich, dass das seltene Monosaccharid 3-O-Methyl-Rhamnose in geringer Konzentration (1,5%) vorkommt.

Beide HMFs von *Ephedra distachya* enthalten einen hohen Gehalt an Arabinose (gemittelt ca. 43%), welches für das Vorhandensein eines Arabinans sprechen würde und für das ungleiche Ara/Gal Verhältnis von gemittelten 1:0,4 verantwortlich ist. Der Galactosegehalt beträgt ca. 14%. Die hohen Mengen an Rhamnose (gemittelt ca. 14%) und Xylose (gemittelt ca. 11%) lassen ebenfalls auf ein Vorkommen von Pektinen bzw. Xylanen schließen. Der Glucosegehalt (gemittelt ca. 11%) in der HMF 2 ist aufgrund einer möglichen Stärkeeinlagerung in der Oktoberernte um fast 10% höher als in der Januarernte. Zudem konnte ebenfalls die 3-O-Me-Rha in geringer Konzentration (gemittelt ca. 3%) nachgewiesen werden.

Die HMF von *Cycas revolutas* zeigt eine hohe Konzentration der Arabinose (29,1%). Das Ara/Gal Verhältnis weicht mit 1:0,7 nicht so stark voneinander ab wie bei beiden HMFs von *Ephedra distachya*. Der Gehalt der Galactose (19,6%) liegt in einem ähnlichen Bereich wie bei den anderen beiden Gymnospermen. Auch hier lässt der hohe Glucosegehalt (21,4%) auf eine Stärkeeinlagerung schließen. Der Gehalt der Xylose (12,0%) lässt ein Vorkommen von Xylanen vermuten. 3-O-Methyl-Rhamnose konnte nicht nachgewiesen werden.

Die HMF von *Encephalartos longifolius* weist eine ähnliche hohe Konzentration der Arabinose (43,2%) wie die HMF 1 von *Ephedra distachya*, welches hier ebenso auf ein Arabinanvorkommen hinweist. Weiterhin konnte die 3-O-Me-Rha mit einem hohen Gehalt von 8,1% nachgewiesen werden. Das ungewöhnliche Ara/Gal Verhältnis mit 1:0,3 liegt in dem hohen Arabinose- und dem niedrigen Galactosegehalt (10,6%) begründet. Da sowohl *Cycas* als auch *Encephalartos* zur gleichen Zeit im Sommer 2018 geerntet worden sind, spricht der ähnliche Glucosegehalt (15,8%) auch hier für eine mögliche Stärkeeinlagerung.

### 3.1.3.3. Neutralzuckeranalyse der Yariv-Fällungen

Nachfolgend sind Ergebnisse der Neutralzuckeranalyse, die Ausbeuten und das Verhältnis von Ara/Gal der nativen AGP-Proben dargestellt (siehe Tabelle 11). Aufgrund der geringen Ausbeute von ca. 6 mg (3.1.1.) wurde von der zweiten Yariv-Fällung (nachfolgend bezeichnet als AGP 2) von *Ephedra distachya* und von *Encephalartos longifolius* nur eine Einfachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 11: Neutralzuckerzusammensetzungen (mol/mol%) der vier Gymnospermen-AGPs

<b>Mono-saccharide</b>	<b><i>Ginkgo biloba</i> AGP in % (mol/mol) n=6</b>	<b><i>Ephedra distachya</i> AGP 1 in % (mol/mol) n=3</b>	<b><i>Ephedra distachya</i> AGP 2 in % (mol/mol) n=1</b>	<b><i>Cycas revoluta</i> AGP in % (mol/mol) n=3</b>	<b><i>Encephalartos longifolius</i> AGP in % (mol/mol) n=1</b>
<b>3-O-Me-Rha</b>	3,7 ± 0,0	12,9 ± 3,1	8,8	-	4,4
<b>Rha</b>	6,8 ± 0,2	3,5 ± 0,4	1,7	9,6 ± 1,1	7,5
<b>Fuc</b>	traces	traces	-	-	0,8
<b>Ara</b>	32,0 ± 3,6	38,9 ± 1,4	36,0	46,6 ± 3,1	36,2
<b>Xyl</b>	traces	1,7 ± 0,6	traces	-	4,7
<b>Man</b>	2,0 ± 0,5	1,6 ± 0,7	1,4	2,5 ± 1,0	8,4
<b>Gal</b>	26,9 ± 0,9	40,0 ± 4,1	47,9	40,2 ± 4,0	23,8
<b>Glc</b>	27,8 ± 1,7	1,3 ± 0,5	3,7	1,1 ± 0,8	14,3
<b>Ausbeute in % (m/m)</b>	47,9 ± 5,2	33,1 ± 3,3	68,9	28,3 ± 4,3	36,7
<b>Ara/Gal in % (mol)</b>	1:0,8	1:1,0	1:1,3	1:0,9	1:0,7

Die Ausbeuten variierten zwischen 33,1-68,9%. Bedingt durch einen Proteinanteil von ca. 10% und einer Verschleppung von weiteren Bestandteilen wie Gerbstoffen, beträgt die Ausbeute keine 100%. Die AGPs wiesen mit Ausnahme des zweiten *Ephedra distachya* AGPs eine leichte Braunfärbung auf, welches für das Vorhandensein von noch gebundenen Gerbstoffbestandteilen sprechen könnte. In allen AGPs wurde erwartet, dass Arabinose und Galactose mengenmäßig am meisten zu finden sind.

Das AGP von *Ginkgo biloba* zeigt wie erwartet hohe Mengen an Arabinose (32,0%) und Galactose (26,9%) und damit ein Ara/Gal Verhältnis von 1:0,9. Besonders auffällig ist der sehr hohe Gehalt von Glucose (27,8%). Um eine mögliche Reduktion des Wertes durch eine Stärkeverunreinigung auszuschließen, wurde mit dem AGP erneut eine 14-tägige Dialyse (Ausschlussgrenze: 12 000-14 000 Dalton, Medicell International LTD, London, England) durchgeführt. Nach dreifacher Acetylierung des dialysierten AGPs wurde ein Glucosewert von 29,5% ± 1,4% ermittelt. Das Ara/Gal Verhältnis lag bei 1:1,0 (28,4%:27,7%) und die gemittelte Ausbeute bei 53,1% ± 1,2%. In Tabelle 12 sind daher die gemittelten Werte des ersten gewonnenen AGPs und des zusätzlich dialysierten AGPs zusammengefasst. Es wurden zwei

weitere Yariv-Fällungen mit einer sehr kleinen Menge der *Ginkgo biloba* Charge durchgeführt. Die gemittelten Acetylierungswerte beider Fällungen sind in Tabelle 12 dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, dass der Glucosewert im Durchschnitt auf 8,0% abgesunken ist. Es ist daher anzunehmen, dass bei der AGP-Hauptfällung das Yariv-Reagenz nicht vollkommen zerstört wurde, sodass ein Teil der glucosehaltigen Bruchstücke noch am AGP gebunden sein könnten.

Tabelle 12: Neutralzuckerzusammensetzung  
(mol/mol%) des zweimalig nachgefällten *Ginkgo biloba* AGPs

<b>Monosaccharide</b>	<b>Nachfällung <i>Ginkgo biloba</i> AGP in % (mol/mol) n=3</b>
<b>3-O-Me-Rha</b>	3,7 ± 1,0
<b>Rha</b>	6,2 ± 1,8
<b>Fuc</b>	-
<b>Ara</b>	35,6 ± 1,7
<b>Xyl</b>	-
<b>Man</b>	2,1 ± 0,7
<b>Gal</b>	44,5 ± 3,8
<b>Glc</b>	8,0 ± 1,4
<b>Ausbeute in % (m/m)</b>	50,1 ± 6,0
<b>Ara/Gal in % (mol/mol)</b>	1:1,3

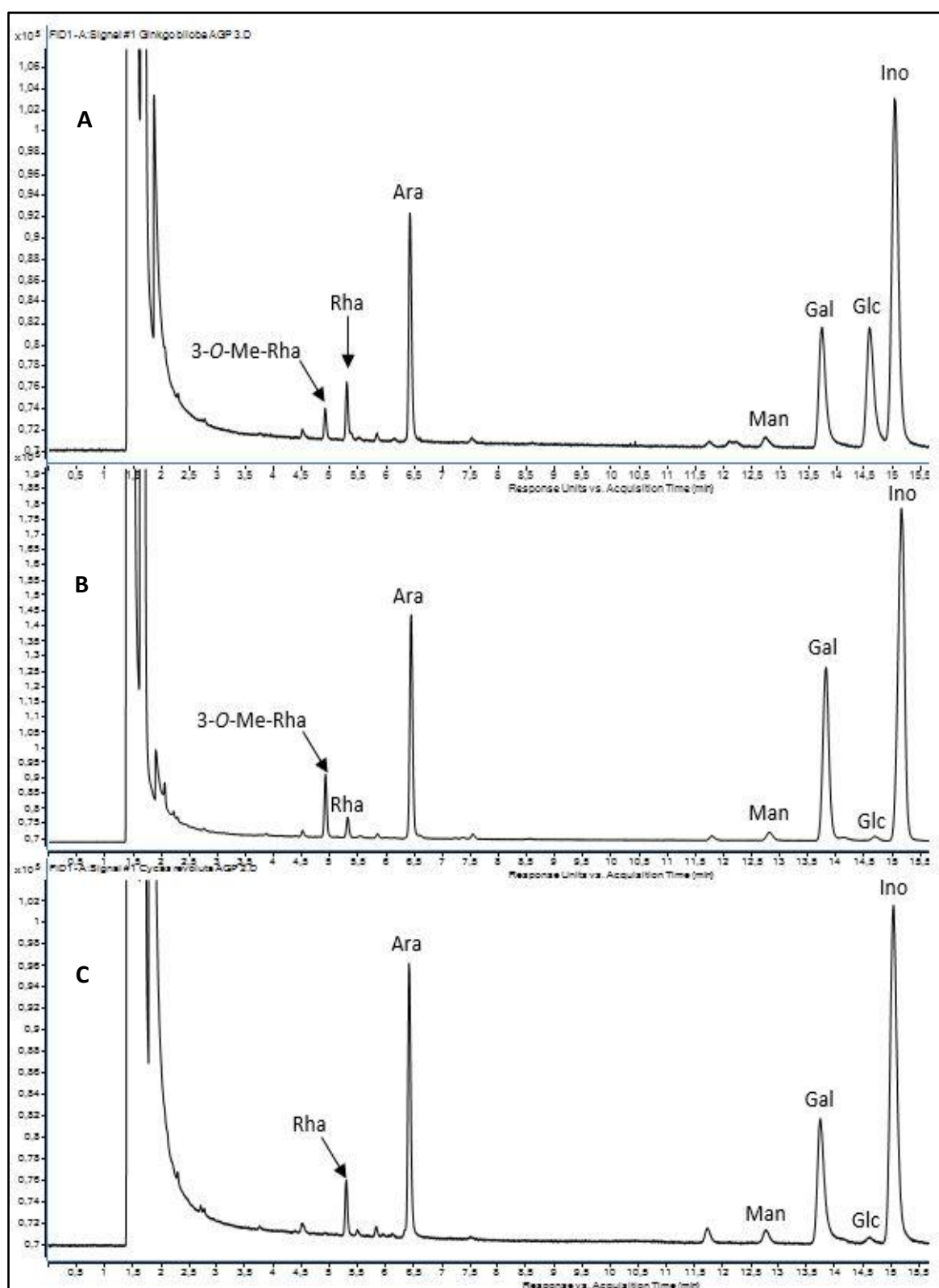
Bei dem AGP von *Ephedra distachya* bilden Arabinose (38,9%) und Galactose (40,0%) mit einem Verhältnis von 1:1,0 die hauptsächlich vorkommenden Monosaccharide. Dieses AGP weist im direkten Vergleich zu den anderen nativen AGPs die höchste Menge der 3-O-Methyl-Rhamnose (12,9%) auf. Das zusätzlich nachgefällte AGP 2 zeigt eine ähnliche Zusammensetzung, wobei die Ausbeute (68,9%) mehr als doppelt so hoch ist, wie die der ersten AGP Charge (33,1%). Wie bereits aufgeführt, könnte diese Ausbeute durch eine gute Aufreinigung entstanden sein. Das *Cycas revoluta* AGP besteht überwiegend aus Arabinose



(46,6%) und Galactose (40,2%) mit einem Verhältnis von 1:0,9. Der Rhamnosegehalt (9,6%) ist am höchsten von allen drei untersuchten Gymnospermen-AGPs. Die 3-O-Methyl-Rhamnose konnte wie in der HMF auch hier nicht nachgewiesen werden. Andere Monosaccharide wie Mannose und Glucose kommen nur in sehr geringen Mengen vor.

Aufgrund der systematischen Nähe wurde für *Encephalartos* eine ähnliche AGP-Zusammensetzung wie bei *Cycas revoluta* erwartet. Dies bestätigte sich allerdings nicht. So liegt der Arabinosegehalt bei 36,2% und der Galactosegehalt bei 23,8%. Das Verhältnis beträgt 1:0,7. Auch konnte im Gegensatz zum *Cycas*-AGP die 3-O-Me-Rha (4,4%) nachgewiesen werden. Allein die Rhamnose liegt in einem ähnlichen Bereich (7,5%). Sehr auffällig ist der zweithöchste Gehalt an Glucose (14,3%).

Nachfolgend sind die Chromatogramme der vier Gymnospermen-AGPs dargestellt (siehe Abbildung 22).



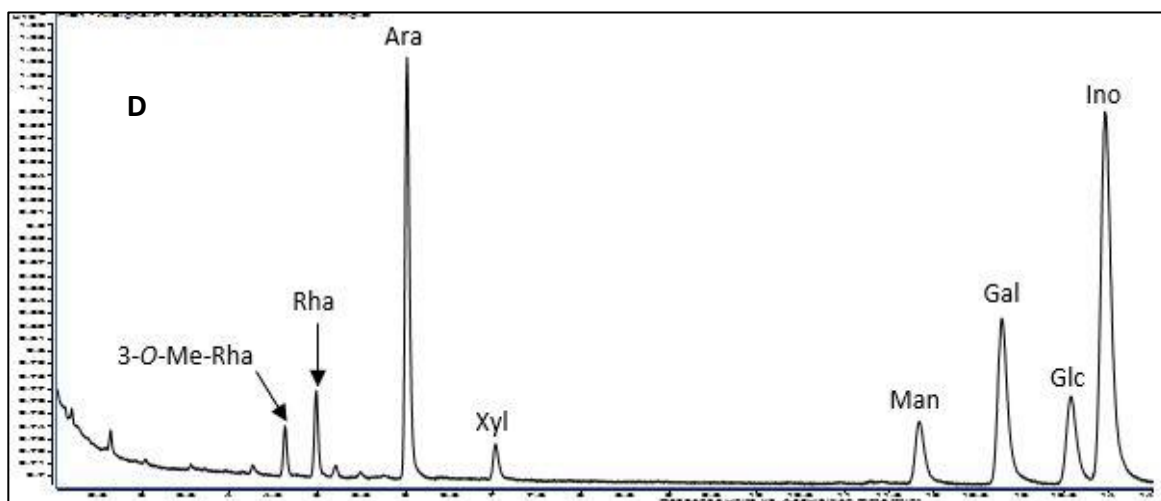


Abbildung 22: Gaschromatogramme der nativen Gymnospermen-AGPs.

A: *Ginkgo biloba* AGP, B: *Ephedra distachya* AGP, C: *Cycas revoluta* AGP, D: *Encephalartos longifolius*

Zusammenfassend zeigt sich bei allen untersuchten AGPs die klassischen AGP-Monosaccharide. Das Ara/Gal-Verhältnis ist im Durchschnitt mit 1:1,2 eher ungewöhnlich. Bei Angiospermen wurde bislang ein Verhältnis von 1:2 beobachtet (Nothnagel, 1997). Weiterhin konnte ein relativ hoher Gehalt von Rhamnose und als Besonderheit 3-O-Methyl-Rhamnose gefunden werden.

#### 3.1.3.4. Neutralzuckeranalyse der Yariv-Überstände

Um zu überprüfen, ob eine vollständige Yariv-Fällung stattfand und einen Einblick in weiter vorkommende Monosaccharide in der Zellwand zu erhalten, wurden die Yariv-Überstände untersucht. Nachfolgend sind die gemittelten Werte der Neutralzuckeranalytik, die Ausbeuten und das Verhältnis von Ara/Gal der Yariv-Überstände dargestellt (siehe Tabelle 13). Die Yariv-Überstände der zweiten *Ephedra distachya* Fällung und jener der *Encephalartos longifolius* Fällung wurden nicht berücksichtigt.

Tabelle 13: Neutralzuckerzusammensetzungen (mol/mol%) der drei Gymnospermen-Yariv-Überstände

<b>Monosaccharide</b>	<b><i>Ginkgo biloba</i> Yariv-Überstand in % (mol/mol) n=3</b>	<b><i>Ephedra distachya</i> Yariv-Überstand 1 in % (mol/mol) n=3</b>	<b><i>Cycas revoluta</i> Yariv-Überstand in % (mol/mol) n=3</b>
<b>3-O-Me-Rha</b>	traces	2,9 ± 1,2	traces
<b>Rha</b>	24,9 ± 0,6	14,0 ± 1,7	7,4 ± 1,2
<b>Fuc</b>	-	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,4
<b>Ara</b>	12,8 ± 0,6	45,9 ± 1,0	37,7 ± 1,1
<b>Xyl</b>	3,0 ± 0,5	12,2 ± 0,3	13,8 ± 1,5
<b>Man</b>	33,2 ± 0,8	5,0 ± 1,2	9,7 ± 1,0
<b>Gal</b>	15,0 ± 0,5	16,2 ± 0,2	18,8 ± 1,4
<b>Glc</b>	10,4 ± 0,3	2,0 ± 0,4	10,8 ± 2,8
<b>Ausbeute in % (m/m)</b>	56,4 ± 6,4	29,1 ± 7,2	39,6 ± 1,0
<b>Ara/Gal in % (mol/mol)</b>	1:1,2	1:0,4	1:0,5

Der Yariv-Überstand enthält alle anderen wasserlöslichen Speicherpolysaccharide und Glykoproteine, welche sich nicht mit dem Yariv-Reagenz ausfällen lassen.

Die Konzentrationen von Rhamnose, Arabinose, Mannose, Glucose und Galactose lassen auf das Vorkommen von Pektinen, Xyloglucanen und Glucomannanen schließen. Im Vergleich zu den HMF konnten keine gravierenden Änderungen der Monosaccharidzusammensetzungen beobachtet werden, da die AGPs nur einen geringen Teil der HMF ausmachen.

Die Ausbeuten variieren stark zwischen 29,1% und 56,4% und sind damit teilweise deutlich höher als jene Ausbeuten der HMFs. Vermutlich wird durch die Behandlung mit Dithionit zur Zerstörung des Yariv-Reagenzes eine weitere Aufreinigung erreicht. Die geringen Mengen an 3-O-Me-Rha weisen darauf hin, dass dieser Zucker vor allem Bestandteil der AGPs ist.

### 3.1.3.5. Neutralzuckeranalyse des Arabinans

Nachfolgend ist die Einzelacetylierung des vermutlich vorkommenden Arabinans in Tabelle 14 dargestellt, welches aus dem 90%igen (v/v) ethanolhaltigen Überstand der zweiten HMF-Fraktion isoliert werden konnte (2.2.1.5.).

Tabelle 14: Neutralzuckerzusammensetzung (mol/mol%) des  
Arabinans von *Ephedra distachya*

<b>Monosaccharide</b>	<b><i>Ephedra distachya</i> Arabinan in % (mol/mol) n=1</b>
<b>3-O-Me-Rha</b>	-
<b>Rha</b>	3,9
<b>Fuc</b>	2,0
<b>Ara</b>	94,1
<b>Xyl</b>	-
<b>Man</b>	-
<b>Gal</b>	-
<b>Glc</b>	-
<b>Ausbeute in % (m/m)</b>	53,7

Wie erwartet, ist der Hauptbestandteil Arabinose (94,1%). Da noch die beiden weiteren Monosaccharide Rhamnose und Fucose detektiert wurden, könnte die Aufreinigung unvollständig sein. Um eine detaillierte Strukturaufklärung mittels Bindungstypanalyse durchführen zu können, hätte die Menge des getrockneten Ausgangsmaterials bei der geringen Arabinanausbeute mindestens das Zehnfache betragen müssen, welches aber aufgrund der begrenzten Materialmengen im Botanischen Garten des Pharmazeutischen Institutes der CAU nicht möglich war. Nachfolgend ist das Gaschromatogramm dargestellt (siehe Abbildung 23).

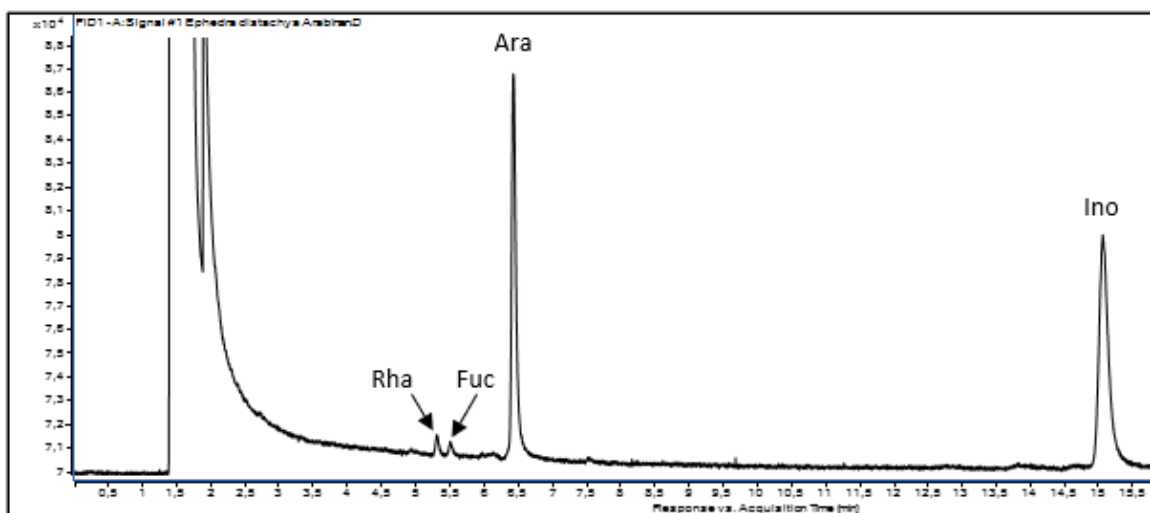


Abbildung 23: Gaschromatogramm des Arabinans aus *Ephedra distachya*

### 3.1.3.6. Kolorimetrische Bestimmung der Uronsäuren

Für die kolorimetrische Bestimmung der Gesamturonsäuren der HMF-Proben, AGP-Proben sowie der Yariv-Überstände wurde die Methode nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) genutzt. Hier gilt es zu berücksichtigen, dass nicht zwischen den Uronsäuren in Landpflanzen, meist Galacturonsäure und Glucuronsäure, unterschieden werden kann.

Nachfolgend sind die Kalibriergeraden abgebildet, welche zur prozentualen Gehaltsbestimmung der Uronsäuren der HMFs, der AGP-Proben (siehe Abbildung 24), des uronsäurereduzierten AGPs von *Ginkgo biloba* (siehe Abbildung 25) und der Yariv-Überstände genutzt wurden (siehe Abbildung 26).

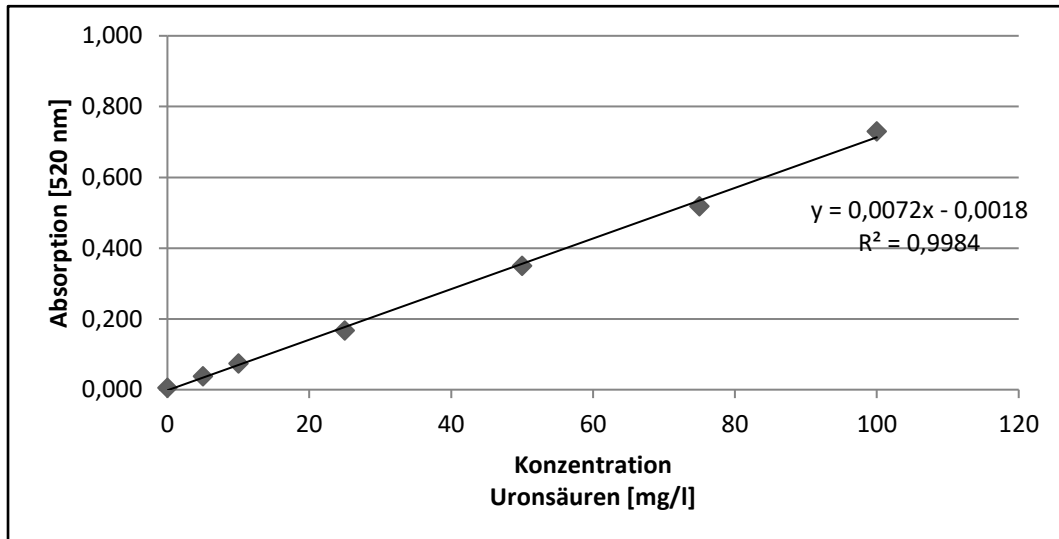


Abbildung 24: Kalibriergerade zur Uronsäurebestimmung der HMFs und nativen AGP-Proben

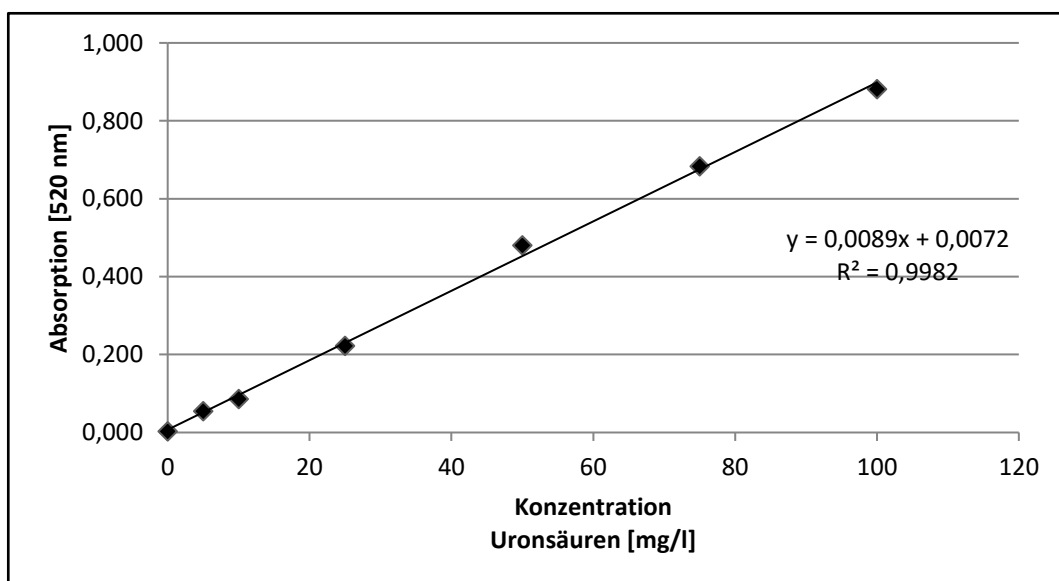


Abbildung 25: Kalibriergerade zur Gesamturonsäurebestimmung des uronsäurereduzierten

*Ginkgo biloba*

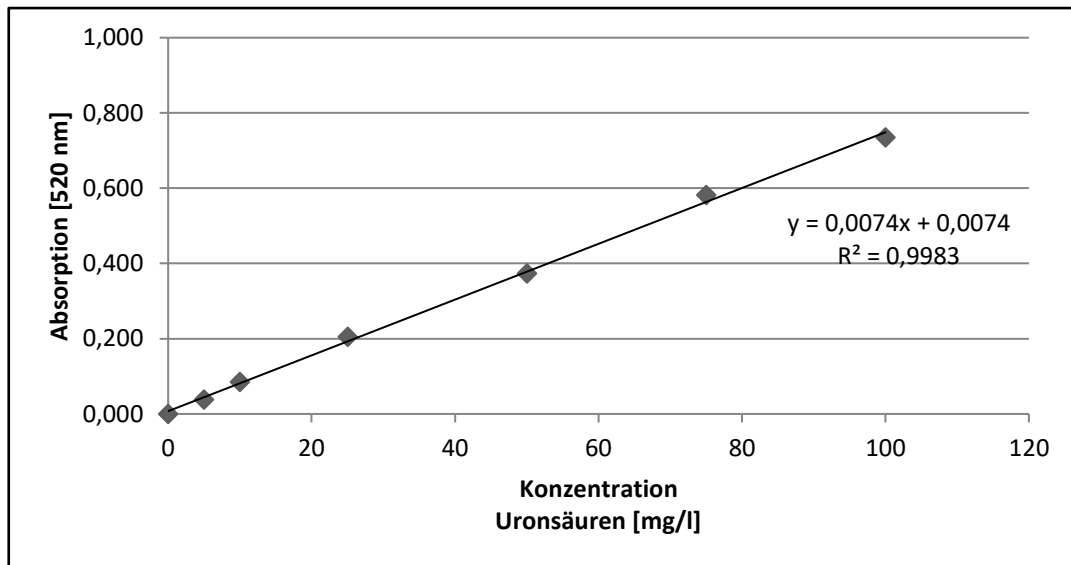


Abbildung 26: Kalibriergerade zur Gesamturonsäurebestimmung der Yariv-Überstände

Es konnten folgende Uronsäuremengen mittels Zweifachbestimmung bzw. Dreifachbestimmung (nur *Ginkgo biloba* AGP<sub>Uron</sub>) ermittelt werden (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Gesamturonsäuren (m/m%) der HMFs, der AGPs sowie der Yariv-Überstände der drei Gymnospermen

Pflanze	Probe	Einwaage [mg]	Gesamturonsäuregehalt in % (m/m)
<i>Ginkgo biloba</i>	HMF	1,18	6,5
<i>Ginkgo biloba</i>	AGP	1,19	7,9
<i>Ginkgo biloba</i>	AGP <sub>Uron</sub>	1,60	2,5
<i>Ginkgo biloba</i>	Yariv-Überstand	0,82	26,5
<i>Ephedra distachya</i>	HMF 1	1,16	7,5
<i>Ephedra distachya</i>	AGP 1	1,07	8,2
<i>Ephedra distachya</i>	Yariv-Überstand	0,86	4,9
<i>Cycas revoluta</i>	HMF	1,02	3,8
<i>Cycas revoluta</i>	AGP	1,08	6,6
<i>Cycas revoluta</i>	Yariv-Überstand	0,95	11,3

Die Uronsäuren aller drei nativen AGP Proben liegen im ähnlichen Bereich zwischen 6,6% (*Cycas revoluta*) und 8,2% (*Ephedra distachya*). Wie erwartet, zeigt das uronsäurereduzierte AGP vom *Ginkgo biloba* den geringsten Gehalt (2,5%), wobei anzunehmen ist, dass



nicht alle Uronsäuren reduziert werden konnten. Der Gehalt der Uronsäuren in den HMFs liegt zwischen 3,8% (*Cycas revoluta*) und 7,5% (*Ephedra distachya*). Jene der Yariv-Überstände zeigen sich sehr variabel zwischen 4,9% (*Ephedra distachya*) und 26,5% (*Ginkgo biloba*). Das Aufkommen hoher Uronsäurewerte spricht vermutlich für eine möglich hohe Konzentration an Pektinen.

### **3.1.3.7. Neutralzuckeranalyse der uronsäurereduzierten AGPs**

Mittels Reduktion der freien Carboxylgruppen mit Natriumborodeuterid zu ihren korrespondierenden zweifach deuterierten Neutralzuckern können Uronsäuren einer Bindungstypanalyse zugänglich gemacht werden. Diese Methode wurde genutzt, um zusätzliche Informationen über den Uronsäuregehalt zu erhalten, da die kolorimetrische Messmethode relativ fehleranfällig ist. Der direkte Vergleich der Neutralzuckeranalytik der nativen AGPs und der uronsäurereduzierten AGPs erlaubt durch eine Begutachtung der entstandenen Differenz der Mengenverhältnisse eine mögliche Quantifizierung der Uronsäuren Galacturonsäure bzw. Glucuronsäure. In den nachfolgenden Tabellen 16-18 sind die Neutralzuckeranalysen der nativen AGPs mit den uronsäurereduzierten AGPs vergleichend dargestellt.

Tabelle 16: Neutralzuckerzusammensetzung (mol/mol%) des nativen AGPs im Vergleich zum uronsäurereduzierten AGP von *Ginkgo biloba*

Monosaccharide	<i>Ginkgo biloba</i> AGP <sub>Nativ</sub> in % (mol/mol) n=6	<i>Ginkgo biloba</i> AGP <sub>Uron</sub> in % (mol/mol) n=3	Differenz in % (mol/mol)
3-O-Me-Rha	3,7 ± 0,0	2,3 ± 0,2	
Rha	6,8 ± 0,2	4,8 ± 0,2	
Fuc	traces	traces	
Ara	32,0 ± 3,6	23,9 ± 1,1	
Xyl	traces	traces	
Man	2,0 ± 0,5	2,8 ± 0,4	
Gal	26,9 ± 0,9	32,4 ± 1,0	+5,5
Glc	27,8 ± 1,7	33,1 ± 1,7	+5,3
Ausbeute in % (m/m)	47,9 ± 5,2	58,0 ± 3,4	
Ara/Gal in % (mol/mol)	1:0,8	1:1,4	

Der Vergleich der *Ginkgo biloba* AGPs zeigt einen Anstieg der Ausbeute des uronsäurereduzierten AGPs (+10,1%) sowie einen nahezu identischen Anstieg von Galactose und Glucose (je ca. 5%), welches auf ein Vorkommen von Galacturon- und Glucuronsäure hinweisen könnte. Die kolorimetrische Bestimmung ergab einen Gehalt von 7,9% an Gesamturonsäuren (3.1.3.6.). Das gleichzeitige Vorkommen von Galacturonsäure und Glucuronsäure konnte in der Bindungstypanalyse (3.1.3.9.) nicht bestätigt werden, wohingegen das Vorkommen von Glucuronsäure anhand des Massenspektrums in der Acetylierungsanalyse des uronsäurereduzierten AGPs nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 17: Neutralzuckerzusammensetzung (mol/mol%) des nativen AGPs im Vergleich zum uronsäurereduzierten AGP von *Ephedra distachya*

Monosaccharide	<i>Ephedra distachya</i> AGP <sub>Nativ</sub> in % (mol/mol) n=3	<i>Ephedra distachya</i> AGP <sub>Uron</sub> in % (mol/mol) n=1	Differenz in % (mol/mol)
3-O-Me-Rha	12,9 ± 3,1	8,4	
Rha	3,5 ± 0,4	3,2	
Fuc	traces	-	
Ara	38,9 ± 1,4	30,6	
Xyl	1,7 ± 0,6	3,1	
Man	1,6 ± 0,7	3,6	
Gal	40,0 ± 4,1	43,2	+3,2
Glc	1,3 ± 0,5	7,9	+6,6
Ausbeute in % (m/m)	33,1 ± 3,3	21,5	
Ara/Gal in % (mol/mol)	1:1,0	1:1,4	

Der Vergleich beider AGPs zeigt einen Abfall der Ausbeute (-11,6%) sowie einen deutlichen Anstieg der Glucose in dem uronsäurereduzierten AGP (+6,6%), welches auf ein Vorkommen von Glucuronsäure hinweist. Galactose stieg um 3,2%, welches ebenfalls für ein geringeres Vorkommen von Galacturonsäure spricht. Die kolorimetrische Bestimmung ergab einen Gesamturonsäuregehalt von 8,2% (3.1.3.6.). Nur das Vorkommen von Glucuronsäure konnte im Massenspektrum der Glucose in der Acetylierungsanalyse im uronsäurereduzierten AGP nachgewiesen werden.

Tabelle 18: Neutralzuckerzusammensetzung (mol/mol%) des nativen AGPs im Vergleich zum uronsäurereduzierten AGP von *Cycas revoluta*

Monosaccharide	<i>Cycas revoluta</i> AGP <sub>Nativ</sub> in % (mol/mol) n=3	<i>Cycas revoluta</i> AGP <sub>Uron</sub> in % (mol/mol) n=1	Differenz in % (mol/mol)
3-O-Me-Rha	-	-	
Rha	9,6 ± 1,1	3,2	
Fuc	-	traces	
Ara	46,6 ± 3,1	43,4	
Xyl	-	-	
Man	2,5 ± 1,0	2,8	
Gal	40,2 ± 4,0	47,2	+7,0
Glc	1,1 ± 0,8	2,8	+1,7
Ausbeute in % (m/m)	28,3 ± 4,3	92,3	
Ara/Gal in % (mol/mol)	1:0,9	1:1,1	

Die vergleichende Auswertung zeigt eine deutliche Zunahme der prozentualen Ausbeute (+64,0%) sowie einen Anstieg der Galactose (+7,0%) und einen leichten Anstieg der Glucose (+1,7%). Die kolorimetrische Bestimmung ergab einen Gesamturonsäuregehalt von 6,6% (3.1.3.6.). Allerdings konnte auch hier nur das Vorkommen von Glucuronsäure im Massenspektrum der Glucose in der Acetylierungsanalyse im uronsäurereduzierten AGP bestätigt werden.

### 3.1.3.8. Neutralzuckeranalytik der partialhydrolysierten AGPs von *Ginkgo biloba*

Zur näheren Strukturcharakterisierung wurde das native AGP von *Ginkgo biloba* für weitere Partialhydrolysen eingesetzt. Das native AGP wurde einer alkalischen Hydrolyse (AGP<sub>Alk</sub>), einer Oxalsäurehydrolyse (AGP<sub>Oxal</sub>) sowie einer Smith-Degradation (AGP<sub>Smith</sub>) unterzogen. Aus dem alkalisch hydrolysierten AGP konnte im Anschluss eine milde Säurehydrolyse mit 0,2 molarer TFA (AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub>) sowie eine Oxalsäurehydrolyse

(AGP<sub>Alk/Oxal</sub>) durchgeführt werden. Letzteres wurde ausschließlich für die Interaktionsmessungen am BLI eingesetzt. Die niedrige Gesamtauswaage ermöglichte keine nähere Charakterisierung mittels analytischer Verfahren. Die Ergebnisse der Neutralzuckeranalytik sind vergleichend zum nativen AGP in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Neutralzuckerzusammensetzungen (mol/mol%) der partialhydrolysierten AGPs im Vergleich zum nativen AGP von *Ginkgo biloba*

<b>Mono-saccharide</b>	<b>AGP<sub>Nativ</sub> in % (mol/mol) n=6</b>	<b>AGP<sub>Alk</sub> in % (mol/mol) n=2</b>	<b>AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> in % (mol/mol) n=2</b>	<b>AGP<sub>Oxal</sub> in % (mol/mol) n=1</b>	<b>AGP<sub>Smith</sub> in % (mol/mol) n=1</b>
<b>3-O-Me-Rha</b>	3,7 ± 0,0	2,8 ± 0,0	3,7 ± 0,2	1,5	6,6
<b>Rha</b>	6,8 ± 0,2	5,7 ± 1,0	5,1 ± 0,3	4,3	traces
<b>Fuc</b>	traces	-	-	traces	-
<b>Ara</b>	32,0 ± 3,6	37,6 ± 0,5	4,0 ± 0,0	4,9	10,7
<b>Xyl</b>	traces	-	traces	traces	1,2
<b>Man</b>	2,0 ± 0,5	2,7 ± 1,4	3,8 ± 0,3	3,7	3,1
<b>Gal</b>	26,9 ± 0,9	37,5 ± 0,9	61,1 ± 0,7	41,2	76,2
<b>Glc</b>	27,8 ± 1,7	13,7 ± 0,9	22,0 ± 0,7	43,9	1,3
<b>Ausbeute in % (m/m)</b>	47,9 ± 5,2	45,5 ± 1,2	40,6 ± 1,4	69,4	11,0
<b>Ara/Gal in % (mol/mol)</b>	1:0,8	1:1,0	1:15,3	1:8,4	1:7,1

Bei der Neutralzuckerzusammensetzung des AGP<sub>Alk</sub> wurde im Vergleich zum AGP<sub>Nativ</sub> keine Änderung der Monosaccharidzusammensetzung erwartet, da bei dieser Methodenbehandlung nur der Proteinanteil zerstört wird und der Kohlenhydratanteil nicht angegriffen wird. Es ist auffällig, dass es zu einer Reduktion des Glucosewertes (-14,1%) kam. Scheinbar sind durch diese Methode einige Bruchstücke des noch gebundenen glucosehaltigen Yariv-Reagenzes zerstört worden. Das Ara/Gal Verhältnis änderte sich auf 1:1,0. Von dem AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> wurde in der Neutralzuckerzusammensetzung eine deutliche Reduktion des Arabinosegehaltes erwartet, welches sich mit einem deutlich verringerten Arabinosewert von 4,0% bestätigt (-28,0%). Das Ara/Gal Verhältnis betrug 1:15,3.

Eine Reduktion des Arabinosewertes wurde ebenfalls bei dem AGP<sub>Oxal</sub> erwartet. Auch hier ist der Arabinosewert deutlich gesunken (-27,1%). Das Ara/Gal-Verhältnis änderte sich auf 1:8,4. Die Ausbeute ist mit 69,4% auffällig hoch.

Bei der Smith-Degradation sollen Monosaccharide mit vicinalen Hydroxylgruppen vollständig zersetzt werden. Das hydrolysierte Polysaccharid besteht hauptsächlich aus Galactose zeigt eine verringerte Menge an Rhamnose, Arabinose, und Glucose. Das Ara/Gal Verhältnis änderte sich auf 1:7,1. Die Ausbeute lag bei nur geringen 11,0%.

### 3.1.3.9. Bindungstypanalyse

Die Strukturanalytik der Monosaccharide mittels Methylierungsanalyse bietet die Möglichkeit, über das grundlegende Verzweigungs- und Bindungstypmuster des Kohlenhydratanteils der AGPs aufzuklären. Mit Hilfe der Bindungstypanalyse nach Harries *et al.* (1984) konnten die Verknüpfungen einzelner Monosaccharide von dem AGP<sub>Nativ</sub>, AGP<sub>Uron</sub>, und von zwei partialhydrolysierten AGPs von *Ginkgo biloba* bestimmt werden. Weiterhin konnten die Monosaccharidzusammensetzungen der nativen AGPs von *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* analysiert werden.

Wie bereits in der Methodik aufgeführt, wurden die entstandenen Massenspektren der permethylierten Alditolacetate (PMAAs) nach einer gaschromatographischen Auftrennung mit den vorhandenen Massenspektren der Arbeitskreisbibliothek verglichen. Kleinere Massenpeaks mussten anhand der ermittelten Retentionszeit ausgewertet werden, da kein aussagekräftiges Massenspektrum vorlag. Übersichtshalber werden die Ergebnisse der nativen AGPs von *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* mit denen der partialsäurehydrolysierten AGPs von *Ginkgo biloba* nachfolgend getrennt dargestellt.

### Vergleichende Auswertung der Bindungstypanalyse der nativen AGPs der drei Gymnospermen

Für die Bindungstypanalyse wurden die drei nativen AGPs der Bindungstypanalyse nach Harries *et al.* (1984) unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Neutralzuckerzusammensetzung (mol/mol%) der PMAAs der drei nativen Gymnospermen AGPs

<b>Bindungstyp</b>	<b>Gemittelte relative Retentionszeit</b>	<b><i>Ginkgo biloba</i> AGP<sub>Nativ</sub> in % (mol/mol)</b>	<b><i>Ephedra distachya</i> AGP 2<sub>Nativ</sub> in % (mol/mol)</b>	<b><i>Cycas revoluta</i> AGP<sub>Nativ</sub> in % (mol/mol)</b>
<b>Arabinose</b> Gesamt		24,0	31,4	39,4
1-Araf	0,200	7,9	26,6	20,9
1-Arap	0,234	traces	traces	3,6
1,2-Araf	0,290	traces	traces	1,4
1,3-Araf	0,298	2,1	-	6,8
1,5-Araf	0,338	12,2	3,6	6,7
<b>Rhamnose</b> Gesamt		4,8	11,9	4,8
1-Rhap/ 3-O-Me-Rhap	0,220	3,1	10,8	4,3
1,2-Rhap	0,321	-	-	traces
1,3-Rhap	0,333	traces	-	-
1,2,4-Rhap	0,458	traces	1,1	-
<b>Glucose</b> Gesamt		4,4	-	2,0
1-Glcp	0,358	4,4	-	2,0
<b>Galactose</b> Gesamt		62,2	55,1	50,7
1-Galp	0,390	2,1	traces	2,0
1,3-Galp	0,520	2,6	7,1	12,7
1,4-Galp	0,536	44,4	5,0	1,1
1,6-Galp	0,609	1,3	3,9	3,7
1,3,6-Galp	0,777	11,8	38,2	31,2
<b>Mannose</b> Gesamt		1,5	1,6	1,6
1,6-Manp	0,596	1,5	1,6	1,6
<b>Sonstige</b> Gesamt		3,1	-	1,5
1,3,4-Hexp (Gal)	0,624	traces	-	1,5
1,2,6-Hexp (Glc/Man)	0,668	1,1	-	-
1,4,6-Hexp	0,727	1,3	-	-
<b>End: Verzweigung</b>		1:0,8	1:1,0	1:1,0

Nach der quantitativen Auswertung der PMAAs konnte gezeigt werden, dass die nativen AGPs der drei Gymnospermen aus den bereits aus Samenpflanzen bekannten typischen Monosaccharidbausteinen bestehen.

Im AGP<sub>Nativ</sub> von *Ginkgo biloba* zeigt sich, dass pyranosidische Galactosebausteine mit 62,2% und furanosidische Arabinose mit 24,0% mengenmäßig am höchsten vertreten sind. Das Grundgerüst besteht überwiegend aus 1,3-Galp mit einer Verzweigung an der Position 6. Der Gehalt von 11,8% lässt auf einen relativ geringen Verzweigungsgrad schließen. Auffällig ist der sehr hohe Gehalt der 1,4-Galp (44,4%). Bei beiden Monosacchariden handelt es sich um Epimere, wodurch das Trennverhalten der Peaks nahezu identisch ist. Um zu differenzieren, ob es sich um 1,4-Galp oder 1,4-Glcp handelt, wurde ein modifiziertes Temperaturprogramm durchlaufen (2.2.3.8.), um die beiden Peaks voneinander trennen zu können. Die Auftrennung beider Peaks sowie die Analyse des Massenspektrums der 1,4-Galp sind in der folgenden Abbildung 27 dargestellt. Die Auswertung im Vergleich mit der bekannten Probe Citruspektin bestätigte, dass es sich um 1,4-Galp handelt (siehe Abbildung 27).

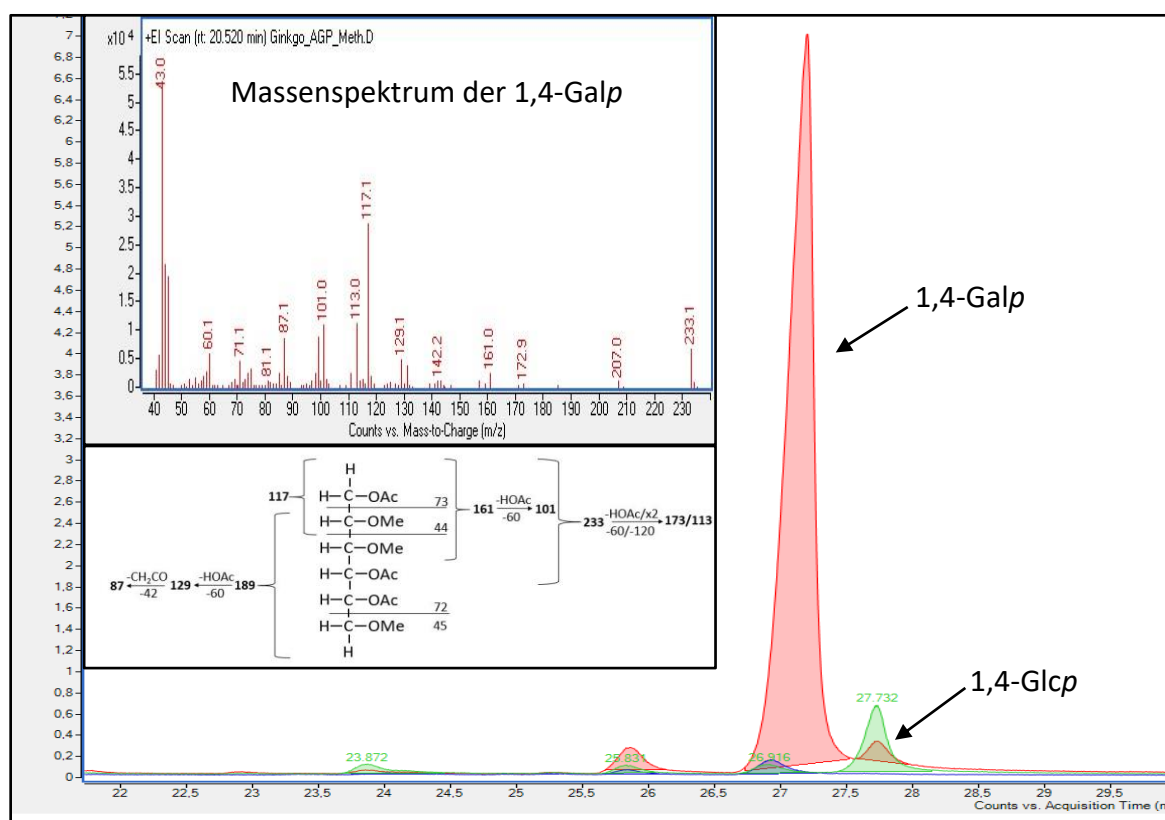


Abbildung 27: Massenspektrometrische Analyse des 1,4-Galp-Peaks aus dem nativen AGP von *Ginkgo biloba*.

Der blaue Peak zeigt die 1,4-Galp der Positivprobe Citruspektin.

Der grüne Peak zeigt die 1,4-Glcp der AGP-Vergleichsprobe *Zostera marina*.



Die 1,4-Galp-Einheiten können mit der 1,3,6-Galp in der Hauptkette verknüpft sein oder den Hauptteil der Seitenketten ausbilden. In den Seitenketten kommen zusätzlich 1,5-Araf (12,2%) und 1,3-Araf (2,1%). Als terminale Endgruppen liegen 1-Araf (7,9%), 1-Glcp (4,4%) bzw. 1-GlcAp sowie 1-Rhap (3,1%) vor, welche in der Methylierungsanalyse nicht von der terminalen 3-O-Me-Rhap unterschieden werden kann. Sehr auffällig ist die Abnahme des Gesamtglucosegehaltes (-23,4%) im Vergleich zur Acetylierung (3.1.3.3.). Durch die Methode können die noch gebundenen glucosehaltigen Yariv-Bruchstücke vom AGP abgetrennt worden sein.

Da sowohl die Strukturmerkmale eines Typ I AGs und eines Typ II AGs vorhanden sind, liegt die Vermutung nahe, dass bei diesem AGP beide AG-Typen vorhanden sind.

Das AGP von *Ephedra distachya* besteht im Grundgerüst ebenfalls aus Galactose- (55,1%) und Arabinosebausteinen (31,4%). Der Gehalt von 38,2% der 1,3-Galp mit einer Verknüpfung an Position 6 lässt auf einen hohen Verzweigungsgrad schließen. Die 1,3,6-Galp kann teilweise mit 1,3-Galp (7,1%) verknüpft sein. Die Seitenketten werden durch 1,4-Galp (5,0%) und 1,6-Galp (3,9%) gebildet. Als terminale Endgruppen kommen eine auffällig hohe Menge an 1-Araf (26,6%) sowie 1-Rhap bzw. 3-O-Me-Rhap (10,8%) vor. Bei diesem AGP von *Ephedra distachya* handelt es sich überwiegend um AGs vom Typ II.

Das Rückgrat des AGPs von *Cycas revoluta* wird ebenfalls aus 1,3,6-Galp (31,2%) mit einem hohen Verzweigungsgrad gebildet, die auch hier mit 1,3-Galp (12,7%) verknüpft sein können. Die Seitenketten werden überwiegend von 1,5-Araf (6,7%), 1,3-Araf (5,8%) sowie 1,6-Galp (3,7%) gebildet. Als terminale Endgruppen kommen 1-Araf (20,9%), 1-Rhap (4,3%), 1-Arap (3,6%), 1-Galp (2,0%) und 1-Glcp bzw. 1-GlcAp (2,0%) vor. Da hier 1,4-verknüpfte Galp vollständig fehlt, besitzt das AGP von *Cycas* ausschließlich AGs vom Typ II.

Das Verhältnis von Endgruppen zu Verzweigungen beträgt bei dem nativen *Ginkgo biloba*-AGP 1:0,8, welches ungewöhnlich ist, da normalerweise eine verringerte Konzentration von Endgruppen zu beobachten ist, die teilweise durch die Stickstoffbegasung verloren gehen können. Die AGPs von *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* zeigen hierzu ein optimales Verhältnis von 1:1,0.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Acetylierung mit der Methylierung der relevantesten Monosaccharide Arabinose und Galactose sowie die Gesamtmengen von Desoxyhexosen, Pentosen und Hexosen verglichen (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen (mol/mol%) der Acetylierungs- (Acetyl.) mit der Methylierungsanalyse (Methyl.) der drei Gymnospermen-AGPs

Mono-saccharide	<i>Ginkgo biloba</i>		<i>Ephedra distachya</i>		<i>Cycas revoluta</i>	
	AGP <sub>Nativ</sub>		AGP 2 <sub>Nativ</sub>		AGP <sub>Nativ</sub>	
	in % (mol/mol)		in % (mol/mol)		in % (mol/mol)	
	Acetyl.	Methyl.	Acetyl.	Methyl.	Acetyl.	Methyl.
<b>Ara</b> Gesamt	32,0	24,0	36,0	31,4	46,6	39,4
<b>Gal</b> Gesamt	26,9	62,2	47,9	55,1	40,2	50,7
<b>Ara/Gal</b>	1:0,8	1:2,6	1:1,3	1: 1,8	1:0,9	1:1,3
<b>Desoxy-hexosen</b>	10,6	4,8	10,7	11,9	9,6	4,8
<b>Pentosen</b>	32,7	24,0	36,3	31,4	46,6	39,4
<b>Hexosen</b>	56,7	71,2	53,0	56,7	43,8	55,8

Die Monosaccharidzusammensetzungen der AGPs zeigen deutliche Abweichungen in der Acetylierung im Vergleich zur Methylierung. Dieses liegt in einer möglichen Untermethylierung einzelner Monosaccharide in der Probe begründet, zudem gehen insbesondere die terminalen furanosidischen Arabinosen während der Begasung der Methylierung leicht verloren, welches bei allen drei nativen AGP-Proben zu beobachten ist. Es kommt durch die prozentuale Umverteilung zu einer mengenmäßigen Erhöhung der jeweiligen Galactosekonzentrationen und damit zu einer Änderung des Ara/Gal Verhältnisses. Es gilt hierbei zu berücksichtigen, dass anstatt der absoluten Werte die relativen Werte angegeben sind. Nachfolgend sind die Gaschromatogramme der PMAAs in Abbildung 28 dargestellt.

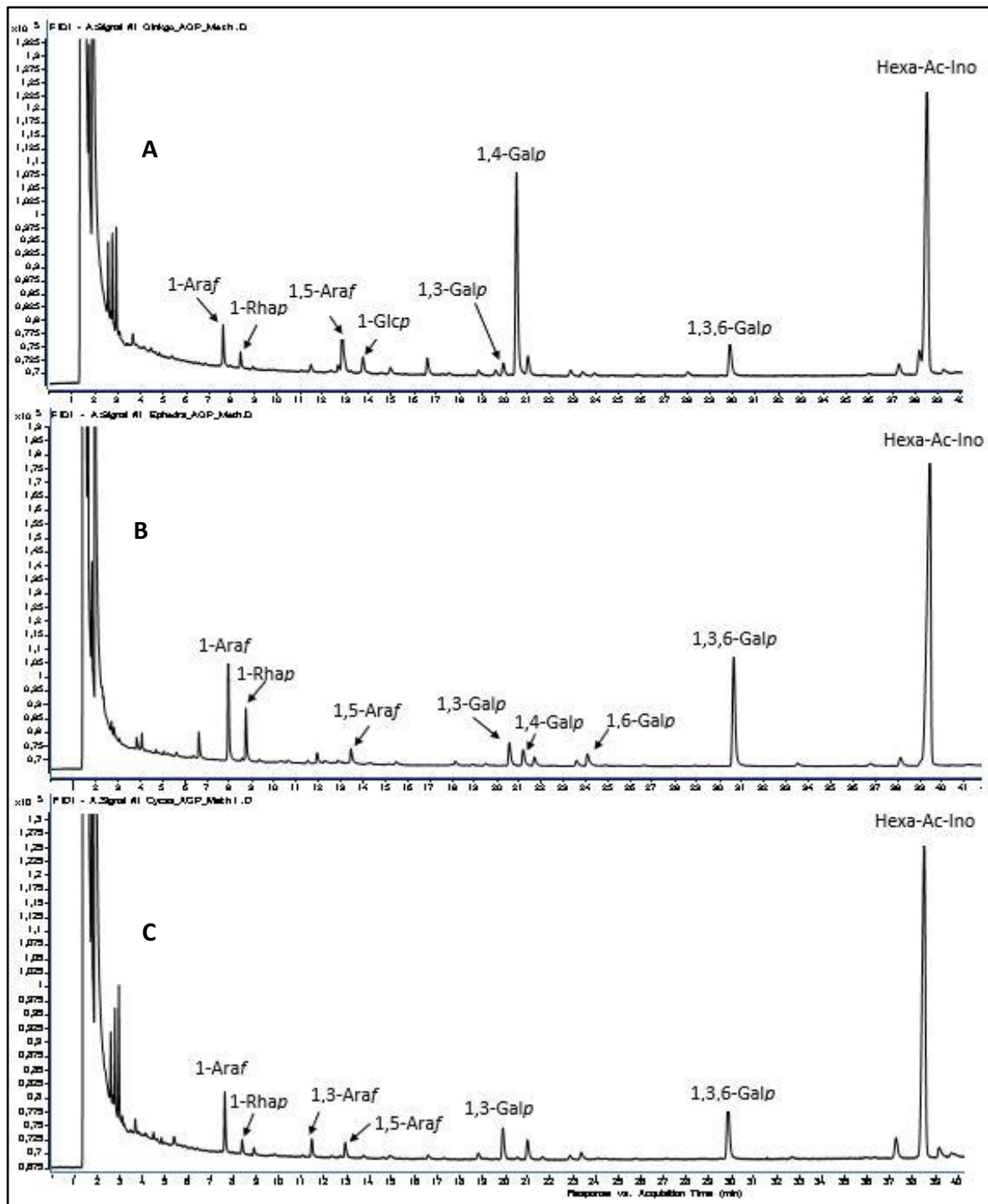


Abbildung 28: Gaschromatogramme der PMAAS der nativen Gymnospermen-AGPs

A: *Ginkgo biloba* AGP<sub>Nativ</sub>, B: *Ephedra distachya* AGP<sub>Nativ</sub>, C: *Cycas revoluta* AGP<sub>Nativ</sub>

### Vergleichende Auswertung der Bindungstypanalyse der partialhydrolysierten AGPs von *Ginkgo biloba*

Für die Bindungstypanalyse wurde das native AGP (AGP<sub>Nativ</sub>), das uronsäurereduzierte AGP (AGP<sub>Uron</sub>), das Oxalsäure hydrolysierte (AGP<sub>Oxal</sub>) und das Smith-degradierte AGP eingesetzt. Eine Auswertung der Smith-Degradation war nicht möglich, da das Grundgerüst des AGPs bei dieser Methode nahezu vollständig zerstört worden ist (Abbildung 29). Das AGP<sub>Alk</sub> wurde zwei Mal dieser Methode unterzogen, jedoch konnten bei beiden Durchführungen keine Ergebnisse erzielt werden, da der Grad der Untermethylierung zu hoch war. Die Zusammensetzung des nativen AGPs wird zum direkten Vergleich noch einmal dargestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Neutralzuckerzusammensetzungen (mol/mol%) der PMAAs des nativen AGPs, des uronsäurereduzierten AGPs und des Oxalsäure hydrolysierten AGPs von *Ginkgo biloba*

Bindungstyp	Gemittelte relative Retentionszeit	AGP <sub>Nativ</sub> in % (mol/mol)	AGP <sub>Uron</sub> in % (mol/mol)	AGP <sub>Oxal</sub> in % (mol/mol)
<b>Arabinose</b> Gesamt		24,0	17,0	5,2
1-Araf	0,199	7,9	10,8	2,3
1-Arap	0,232	traces	traces	-
1,2-Araf	0,288	traces	0,3	-
1,3-Araf	0,298	2,1	1,6	-
1,5-Araf	0,336	12,2	3,9	2,8
<b>Rhamnose</b> Gesamt		4,8	5,9	3,6
1-Rhap/ 3-O-Me-Rhap	0,219	3,1	4,4	3,2
1,2-Rhap	0,321	-	0,4	-
1,4-Rhap	0,327	-	0,4	0,4
1,3-Rhap	0,333	traces	-	-
1,2,4-Rhap	0,455	traces	traces	-
<b>Glucose</b> Gesamt		4,4	1,5	3,0
1-Glcp/ 1-GlcAp	0,359	4,4	1,5	3,0

				Ergebnisse
<b>Galactose</b> Gesamt		62,2	68,5	82,6
1-Galp	0,389	2,1	traces	1,7
1,3-Galp	0,519	2,6	5,1	2,6
1,4-Galp	0,534	44,4	46,0	59,7
1,6-Galp	0,608	1,3	1,2	8,5
1,3,6-Galp	0,776	11,8	15,6	10,1
<b>Mannose</b> Gesamt		1,5	0,9	0,4
1,6-Manp	0,596	1,5	traces	traces
<b>Xylose</b> Gesamt		-	0,5	-
1,3,4-Xylp	0,510	-	traces	-
<b>Sonstige</b> Gesamt		3,1	5,7	5,2
1,3,4-Hexp (Gal)	0,625	traces	traces	traces
1,3,4-Hexp (Glc)	0,641	-	1,5	-
1,2,3-Hexp	0,644		-	1,4
1,2,6-Hexp (Glc/Man)	0,771	1,1	traces	1,1
1,4,6-Hexp (Glc)	0,728	1,3	2,5	2,4
1,4,6-Hexp (Gal)	0,743	-	traces	-
<b>End:</b>				
<b>Verzweigung</b>		1:0,8	1:0,8	1:0,7

Beim AGP<sub>Uron</sub> wurde erwartet, dass es zu einer Zunahme der 1-Glcp kommt, da terminale Glucuronsäuren, wie sie häufig in AGPs vorkommen, nach deren Reduktion als 1-Glcp vorliegen und es damit zu einer Gesamtmengenerhöhung kommen sollte. Dies war allerdings nicht der Fall, so dass durch diese Methode keine Aussage über einen möglichen Uronsäuregehalt getroffen werden kann.

Beim AGP<sub>Oxal</sub> wurden die endständigen furanosidischen Arabinosen abgespalten, welches sich im gesunkenen Gesamtarabinosegehalt zeigt (-18,8%). Der Gehalt der 1,6-Galp ist deutlich im Vergleich zum nativen AGP angestiegen (+7,2%), welches die Vermutung zulässt, dass sich Arabinosen an Position 3 der 1,3,6-Galp befinden. Alle anderen Monosaccharide weisen eine ähnlich prozentuale Zusammensetzung wie das native AGP auf.

Alle AGPs zeigten ein Verhältnis der Endgruppen zu Verzweigungen von ca. 1:0,8 und spricht für eine leichte Untermethylierung von Monosacchariden. Es ist auffällig, dass die Menge der Verzweigungspunkte geringer ist, da normalerweise Endgruppen, wie bereits beschrieben, insbesondere die Arabinosen bei der Begasung verloren gehen können. Zum

direkten Vergleich sind die relevanten Monosaccharide Arabinose und Galactose aus der Acetylierung mit denen aus der Methylierung aufgezeigt (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen (mol/mol%) der Acetylierungs (Acetyl.) mit der Methylierungsanalyse (Methyl.) des nativen AGPs, des uronsäurereduzierten AGPs und des Oxalsäure hydrolysierten AGPs von *Ginkgo biloba*

Monosaccharide	<i>Ginkgo biloba</i>		<i>Ginkgo biloba</i>		<i>Ginkgo biloba</i>	
	AGP <sub>Nativ</sub>		AGP <sub>Uron</sub>		AGP <sub>Oxal</sub>	
	in % (mol/mol)		in % (mol/mol)		in % (mol/mol)	
	Acetyl.	Methyl.	Acetyl.	Methyl.	Acetyl.	Methyl.
<b>Ara</b> Gesamt	32,0	24,0	23,9	17,0	4,3	5,2
<b>Gal</b> Gesamt	26,9	62,2	32,4	68,5	41,1	82,6
<b>Ara/Gal</b>	1:0,8	1:2,6	1:1,4	1:6,3	1:8,4	1:15,9
<b>Desoxyhexosen</b>	10,7	4,8	7,2	5,9	5,9	3,6
<b>Pentosen</b>	32,7	24,0	24,5	17,0	5,3	5,2
<b>Hexosen</b>	56,7	71,2	68,3	77,1	88,8	91,2

Der Gesamtarabinosegehalt ist im Vergleich vom nativen zum uronsäurereduzierten AGP deutlich abgesunken, welches für einen Verlust der Arabinosen während der Begasung sprechen könnte. Der Glucosewert ist bei allen drei AGPs deutlich gesunken. Wie bereits aufgeführt, können durch die umfangreiche Methode der Bindungstypanalyse die noch gebundenen Glucoseeinheiten des Yariv-Reagenzes zerstört bzw. entfernt worden sein. Wie auch bei den anderen Gymnospermen-AGPs kommt es durch den Verlust der Arabinosen und insbesondere der Glucose zu einer prozentualen Umverteilung und damit zu einem deutlich prozentualen Anstieg der Galactose in allen drei *Ginkgo biloba* Proben sowie zu einer Änderung des Ara/Gal Verhältnisses. Auch hier wurden die relativen Werte angegeben. Nachfolgend sind die Gaschromatogramme der partialhydrolysierten AGPs dargestellt (siehe Abbildung 29).

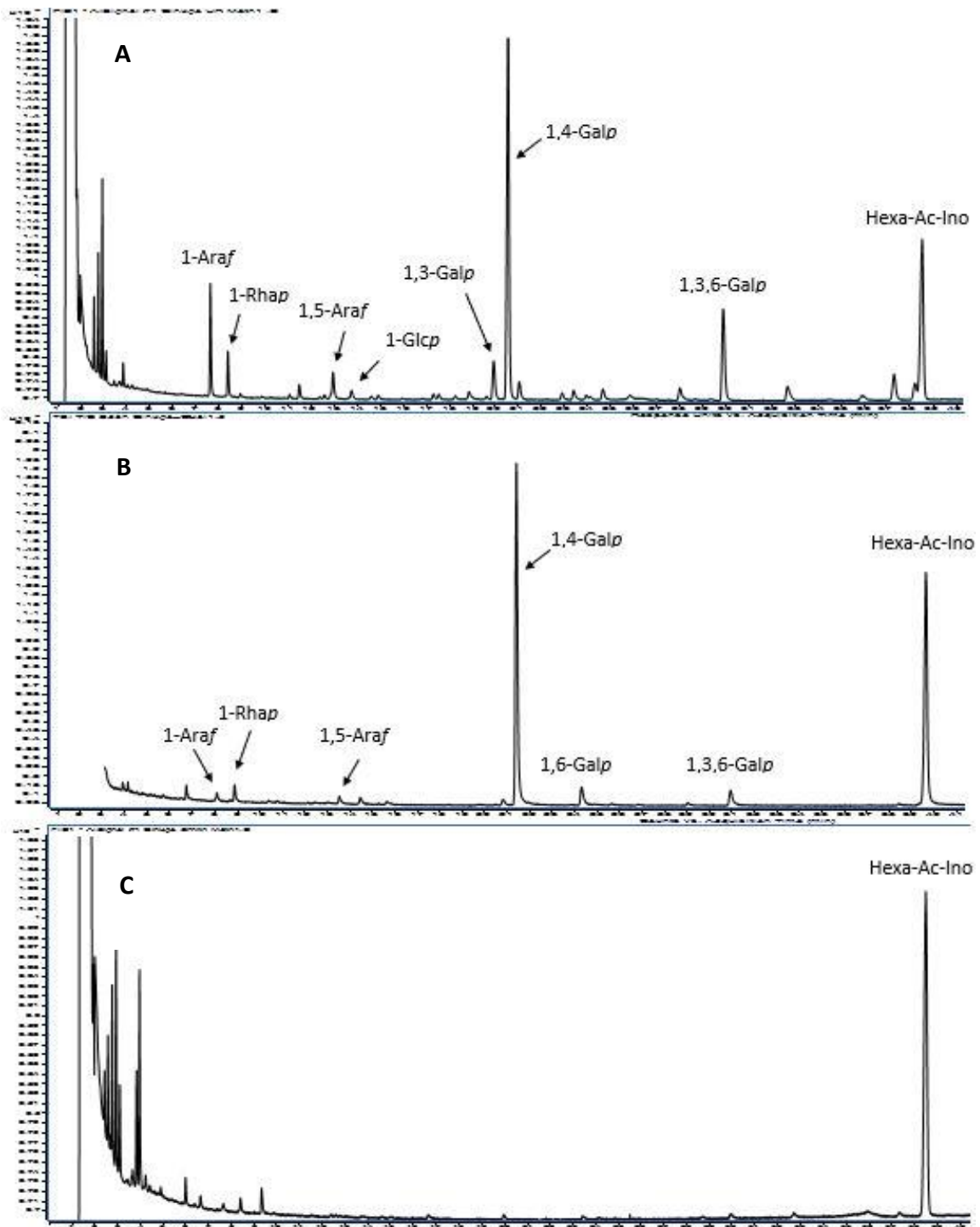


Abbildung 29: Gaschromatogramme der PMAAs der partialhydrolysierten *Ginkgo biloba* AGPs

A: Uronsäurereduziertes AGP, B: Oxalsäure hydrolysiertes AGP, C: Smith-degradiertes AGP

### 3.1.4. Charakterisierung des Proteinanteils

#### 3.1.4.1. Gehaltsbestimmung von Hydroxyprolin in den AGPs

Durch das nach der Reaktion entstandene Farbprodukt konnte eine photometrische Messung erfolgen. Für die Gehaltsbestimmung des Hydroxyprolins der drei nativen Gymnospermen-AGPs wurde folgende Kalibriergerade verwendet (siehe Abbildung 30). Hier wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt.

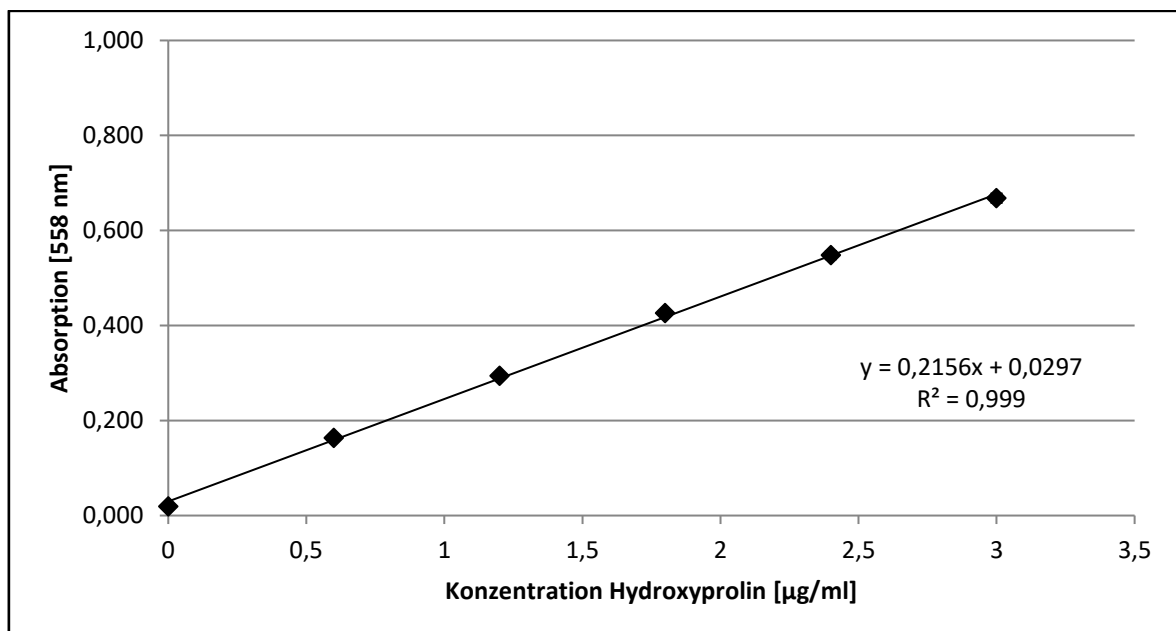


Abbildung 30: Kalibriergerade zur Hydroxyprolinbestimmung der drei nativen Gymnospermen-AGPs

Für die Gehaltsbestimmung des Hydroxyprolins vom alkalisch hydrolysierten *Ginkgo biloba* AGP wurde folgende Kalibriergerade verwendet (siehe Abbildung 31). Hier wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.



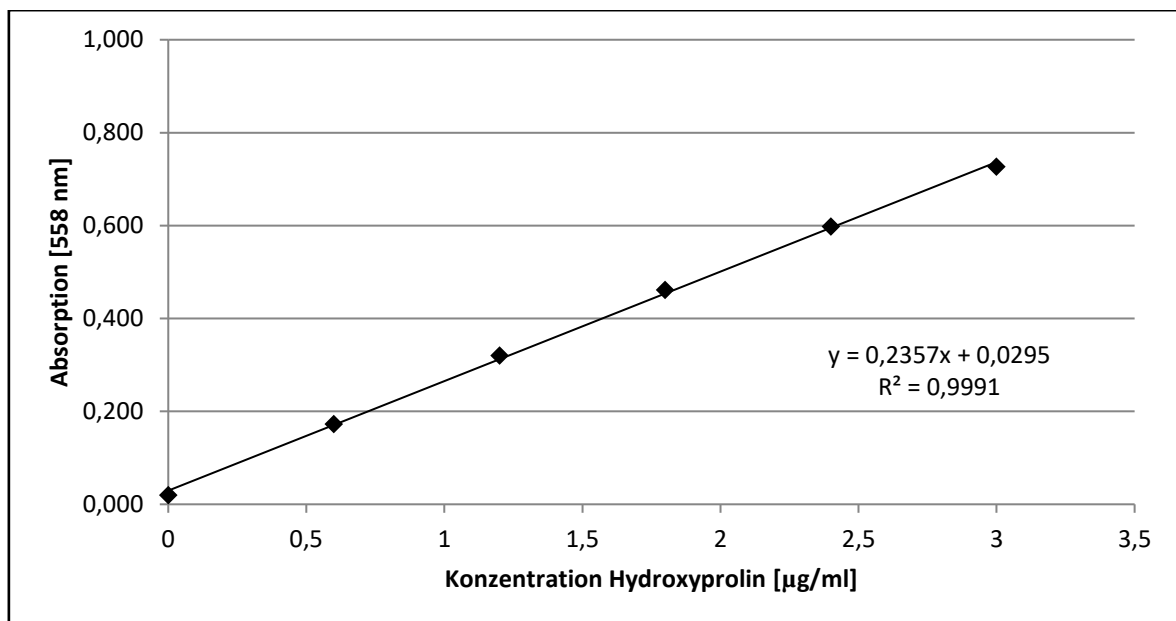


Abbildung 31: Kalibriergerade zur Hydroxyprolinbestimmung des alkalisch hydrolysierten *Ginkgo biloba* AGPs

Mithilfe der gemittelten Absorptionen der Proben und der Kalibriergeraden konnten die Hydroxyprolinkonzentrationen errechnet werden, mit welchen der Hydroxyprolingehalt auf die Einwaage zurückgerechnet werden konnte (siehe Tabelle 24). Die Standardabweichungen der Absorptionswerte waren mit Werten zwischen 0,001 - 0,017 so gering, dass diese nicht aufgeführt werden.

Tabelle 24: Konzentration (m/m%) von Hydroxyprolin in den drei Gymnospermen-AGPs

Probe	Ein- waage [mg]	Mittlere Absorption	Konzentration in % (m/m)
<i>Ginkgo biloba</i> AGP <sub>Nativ</sub>	7,25	0,448	0,49
<i>Ginkgo biloba</i> AGP <sub>Alk</sub>	5,43	0,334	0,32
<i>Ephedra distachya</i> AGP 1 <sub>Nativ</sub>	3,12	0,641	0,71
<i>Cycas revoluta</i> AGP <sub>Nativ</sub>	6,35	0,521	1,14

Der Gehalt von Hydroxyprolin liegt im AGP von *Cycas revoluta* bei 1,14%, im AGP von *Ephedra distachya* bei 0,71% und beim *Ginkgo biloba* AGP bei 0,49%.

Bei der alkalischen Hydrolyse wird der Proteinteil des AGPs zerstört und es verbleibt die Aminosäure für die Bindung am AGP erhalten. Mit Hilfe der Hydroxyprolinbestimmung konnte im alkalisch hydrolysierten *Ginkgo biloba* AGP ein Hydroxyprolingehalt von 0,32% nachgewiesen werden. Dieses belegt, dass Hydroxyprolin für die Bindung des Kohlenhydrat- mit dem Proteinteil in diesem AGP verantwortlich ist.

### 3.1.4.2. Elementaranalyse

Mit Hilfe der Elementaranalyse konnte der Gehalt von Stickstoff (N), Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H) und Schwefel (S) bestimmt werden. Der Stickstoffgehalt diente hierbei zur Berechnung des Proteingehaltes, welcher nach Kieldahl mit dem Faktor 6,25 multipliziert wird. Für die nativen AGPs der drei Gymnospermen konnten folgende Werte ermittelt werden (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Ergebnisse der Elementaranalyse der drei nativen Gymnospermen-AGPs

Probe	N in % (m/m)	C in % (m/m)	H in % (m/m)	S in % (m/m)	Protein- gehalt in % (m/m)	Verhält- nis C zu H
<b><i>Ginkgo biloba</i></b> AGP <sub>Nativ</sub>	1,15	40,10	6,82	1,19	7,19	1:2,040
<b><i>Ephedra</i></b> <b><i>distachya</i></b> AGP 1 <sub>Nativ</sub>	1,19	37,86	6,69	2,22	7,44	1:2,121
<b><i>Cycas revoluta</i></b> AGP <sub>Nativ</sub>	0,81	25,04	4,83	3,62	5,06	1:2,317

Sauerstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff bilden die Hauptbestandteile, da die AGPs zu 90% aus einem Kohlenhydratanteil bestehen. Für die Bestimmung des Proteingehaltes konnte für das *Ginkgo biloba* AGP ein Wert von 7,19%, für das *Ephedra distachya* AGP 1 7,44% und

für das *Cycas revoluta* AGP 5,06% errechnet werden. Da der Proteingehalt des AGPs maximal ca. 10% ausmacht, befinden sich alle drei Werte im entsprechenden Bereich der Samenpflanzen (Nothnagel, 1997). Über eine Umrechnung des Kohlenhydrat- und Wasserstoffanteils von Massenprozent in Molprozent konnte ein AGP typisches Verhältnis von 1:2 aller drei AGPs errechnet werden.

Der geringe Schwefelgehalt kann durch das Vorhandensein von Dithionitbruchstücken, welches zur Trennung des Yariv-AGP-Komplexes eingesetzt wurde und/oder durch das Vorkommen von schwefelatomhaltigen Aminosäuren wie Cystein und/oder Methionin begründet werden.

### 3.1.5. Isolierung weiterer Polysaccharide aus *Ginkgo biloba*

#### 3.1.5.1. Ausbeuten der Extrakte

Aus dem nach der Wasserextraktion anfallenden getrockneten Presskuchen von *Ginkgo biloba* konnten aus eingesetzten 10 g insgesamt vier Fraktionen mit unterschiedlicher Ausbeute gewonnen werden (siehe Tabelle 26). Für den vorherig durchgeführten Isolierungsvorgang wurden ca 89 g an Trockenmasse eingesetzt.

Tabelle 26: Auswaagen von vier Extrakten aus dem Presskuchen von *Ginkgo biloba*

Fraktion	Auswaage [mg]	% bezogen auf den eingesetzten Presskuchen	% bezogen auf gesamte einge- setzte getrocknete Einwaage
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	636,81	6,37	5,65
HCl	328,23	3,28	2,91
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	818,25	8,18	7,26
KOH	1 902,19	19,02	16,89

Die KOH-Extraktion ergab bei den vier Extraktionen den größten Anteil (19,02%). Die drei anderen Extraktionen lagen jeweils unter 10%, die Menge der HCl-Fraktion war am geringsten (3,28%). Der restlich anfallende Teil beläuft sich auf 63,15%, welcher überwiegend aus Cellulose bestehen dürfte.

### 3.1.5.2. Neutralzuckeranalyse der Extrakte

Die Ergebnisse der Neutralzuckeranalytik sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Neutralzuckerzusammensetzungen der vier Extrakte aus dem Presskuchen von  
*Ginkgo biloba*

<b>Mono- saccharide</b>	<b>HMF Fraktion In % (mol/mol) n=3</b>	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Fraktion in % (mol/mol) n=3</b>	<b>HCl Fraktion in % (mol/mol) n=3</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Fraktion in % (mol/mol) n=3</b>	<b>KOH Fraktion in % (mol/mol) n=3</b>
<b>3-O-Me- Rha</b>	1,5 ± 1,1	1,0 ± 1,1	-	traces	-
<b>Rha</b>	18,5 ± 1,5	12,7 ± 1,7	1,3 ± 0,3	3,3 ± 0,6	traces
<b>Fuc</b>	-	-	traces	traces	traces
<b>Ara</b>	17,0 ± 1,7	41,9 ± 5,5	28,6 ± 5,4	29,3 ± 3,1	8,5 ± 0,9
<b>Xyl</b>	3,2 ± 0,5	-	traces	1,6 ± 0,7	3,3 ± 0,3
<b>Man</b>	20,3 ± 1,0	3,7 ± 0,3	1,1 ± 0,1	traces	-
<b>Gal</b>	15,8 ± 0,4	5,2 ± 0,9	3,1 ± 0,2	3,7 ± 0,2	1,4 ± 0,1
<b>Glc</b>	23,7 ± 3,4	35,5 ± 6,6	64,6 ± 5,6	61,6 ± 3,7	86,0 ± 3,1
<b>Ausbeute in % (m/m)</b>	17,0 ± 0,1	44,5 ± 4,8	61,0 ± 2,6	52,0 ± 11,0	62,2 ± 3,1

Zur vergleichenden Ansicht sind die Ergebnisse als Balkendiagramm dargestellt (siehe Abbildung 32).

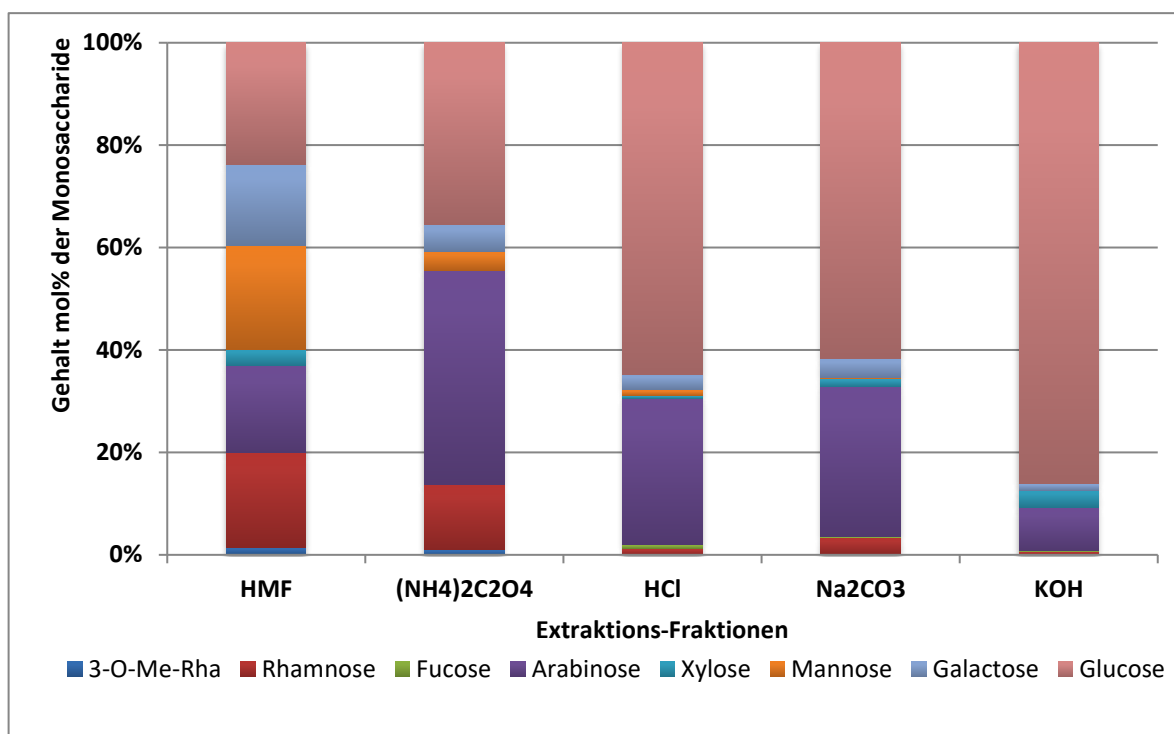


Abbildung 32: Konzentrationen (mol/mol%) der Monosaccharide der fünf Extraktions-Fractionen

In dem Ammoniumoxalateextrakt bilden Arabinose (41,9%), Glucose (35,5%) und Rhamnose (12,7%) die Hauptmonosaccharide. In geringer Konzentration konnte Galactose (5,2%) und Mannose (3,7%) nachgewiesen werden. Die HCl- sowie die Natriumcarbonatfraktion bestehen überwiegend aus Arabinose (gemittelt ca. 29%) sowie Glucose (gemittelt ca. 63,1%) und zeigen damit sehr ähnliche Konzentrationen. Galactose und Rhamnose kommen in geringer Konzentration unter 5% vor. Die KOH-Fraktion besteht überwiegend nur noch aus Glucose (86%). Der Arabinosegehalt ist deutlich gesunken (8,5%). Diese Fraktion zeigt den höchsten Gehalt an Xylose (3,3%). Galactose kommt in sehr geringer Menge vor (1,4%). Die Ausbeute aller vier Fraktionen liegt zwischen ca. 45% und ca. 62%. Die teilweise hohen Standardabweichungen lassen sich dadurch erklären, dass eine homogene Verteilung durch Vermischen der Probe nicht möglich war, da die Fraktionen nach der Trocknung eine sehr feste watteartige Konsistenz aufwiesen.

### 3.1.5.3. Kolorimetrische Bestimmung von Uronsäuren der Extrakte

Die kolorimetrische Bestimmung wurde zur Bestimmung der Uronsäuren der vier unterschiedlichen Extrakte genutzt. Nachfolgend ist die Kalibriergerade abgebildet, welche zur prozentualen Gehaltsbestimmung der Fraktionsproben genutzt wurde (siehe Abbildung 33).

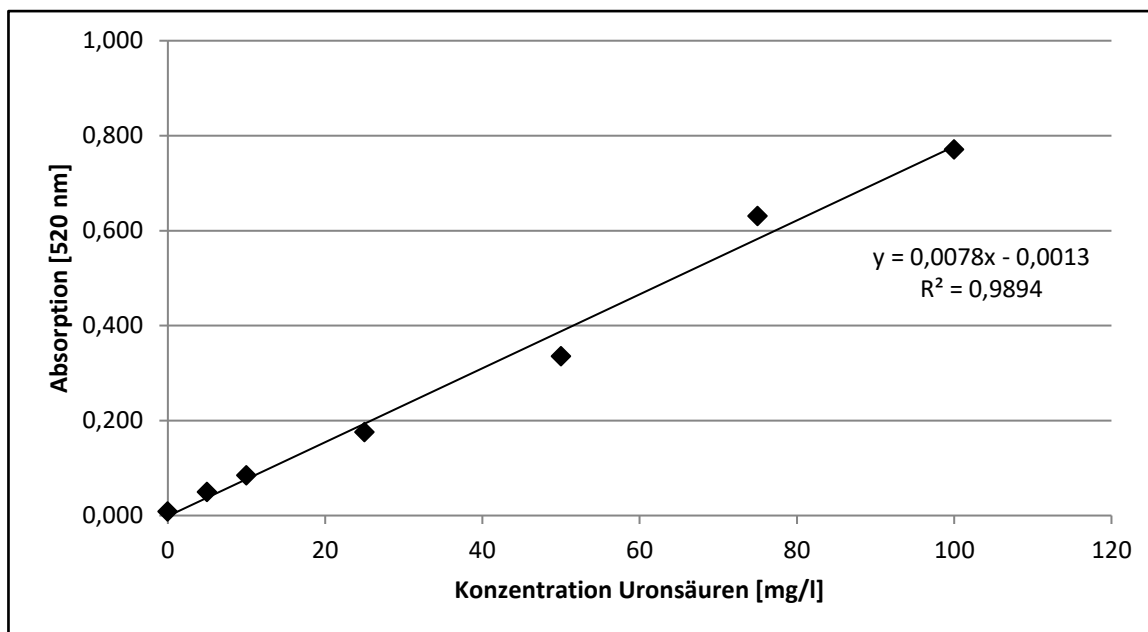


Abbildung 33: Kalibriergerade zur Uronsäurebestimmung der vier Extrakte aus dem Presskuchen von *Ginkgo biloba*

Damit konnten folgende Gehälter mittels Zweifachbestimmung ermittelt werden (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Gehalt der Uronsäuren von vier Extrakten aus dem Presskuchen von *Ginkgo biloba*

Fraktion	Einwaage [mg]	Uronsäuregehalt in % (m/m)
$(\text{NH}_4)_2 \text{C}_2\text{O}_4$	2,4	36,7
HCl	2,2	12,9
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	3,0	3,9
KOH	2,1	1,8

Der Gehalt der  $(\text{NH}_4)_2 \text{C}_2\text{O}_4$ -Fraktion war mit Abstand von 36,7% am höchsten. Der Gehalt der HCl-Fraktion lag bei 12,9%, bei der  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Fraktion bei 3,9% und bei der KOH-Fraktion bei 1,8%. Ein hoher Gehalt an Gesamturonsäuren könnte auf eine hohe Pektinkonzentration hinweisen.

### **3.1.6. Größenausschlusschromatographie mit Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS)**

Mittels SEC-MALLS wurde eine Molekulargewichtsbestimmung bzw. eine Bestimmung des hydrodynamischen Volumens verschiedener AGP-Proben durchgeführt. Da die Methode der Molekulargewichtsbestimmung über den MALLS eine Absolutmessung ist, werden hierfür keine Standards benötigt. Das hydrodynamische Volumen ist von verschiedenen Faktoren wie Molekulargewicht, Ladung und Verzweigungsgrad abhängig, daher kommt es bei der Auftrennung zu unterschiedlichen Retentionszeiten. Das hydrodynamische Volumen der AGP-Proben wurde über eine Kalibriergerade von drei Pullulanstandards mit bekannten Molekulargewichten von 20 kDa, 200 kDa und 800 kDa bestimmt ( $y=23427e^{-0,208x}$ ,  $R^2=0,9819$ ).

#### **3.1.6.1. Molekulargewichtsbestimmung**

Nachfolgend sind die Chromatogramme der einzelnen AGP-Proben sowie die ermittelten Molekulargewichte mit den Massenanteilen dargestellt (siehe Abbildung 34).

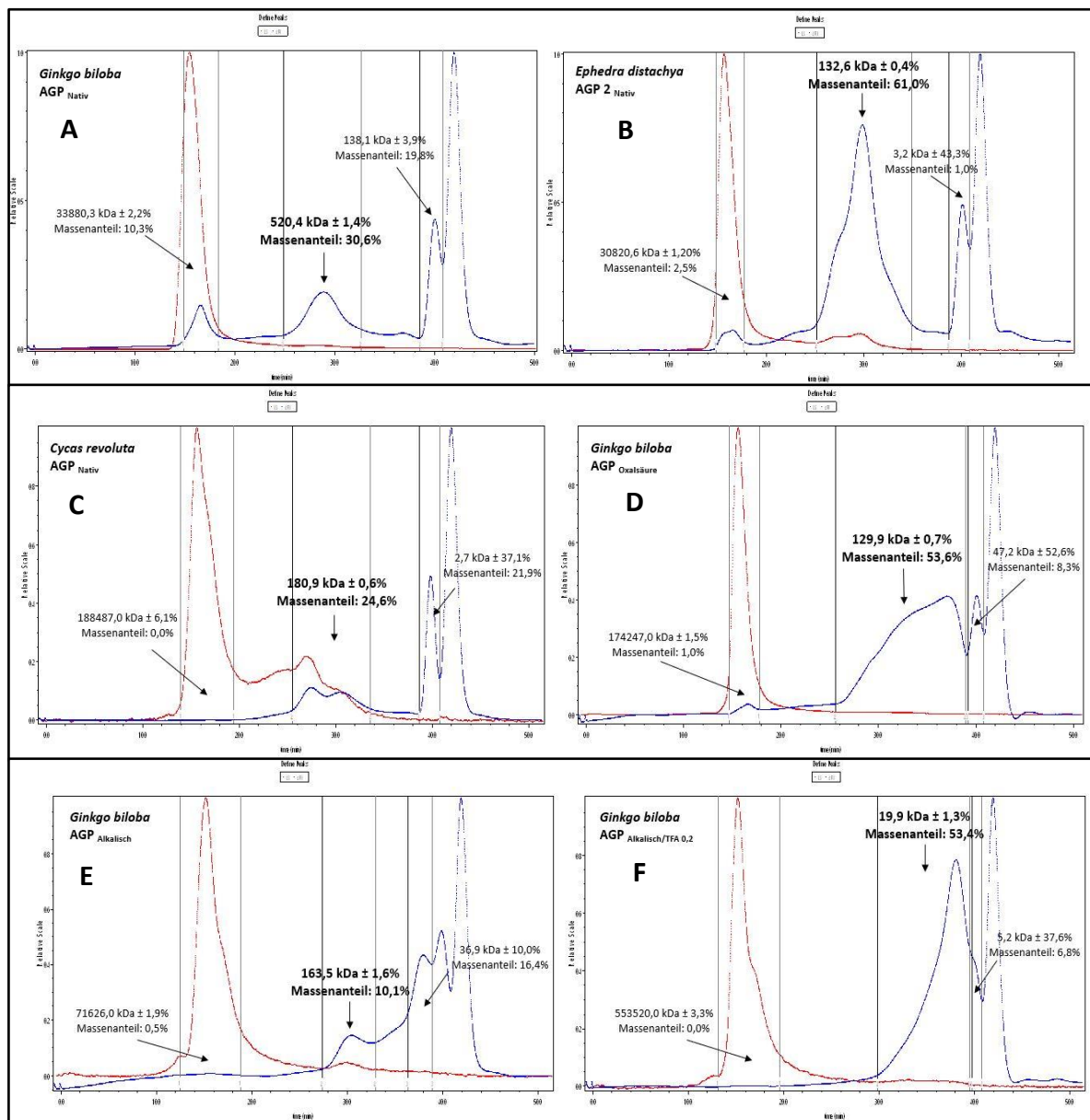


Abbildung 34: GPC-Chromatogramme der nativen Gymnospermen-AGPs und der partialhydrolysierten *Ginkgo biloba* AGPs. A: *Ginkgo biloba* AGP<sub>Nativ</sub>, B: *Ephedra distachya* AGP<sub>Nativ</sub>, C: *Cycas revoluta* AGP<sub>Nativ</sub>, D: *Ginkgo biloba* AGP<sub>Oxal</sub>, E: *Ginkgo biloba* AGP<sub>Alk</sub>, F: *Ginkgo biloba* AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub>

Rot: Signal des MALLS; Blau: Signal des RI-Detektors

Für die Auswertung des AGP-Molekulargewichtes wurde für jede Probe nur der zweite Peak herangezogen, da sich das ermittelte Molekulargewicht in dem für AGP typisch liegenden Molekulargewichtsbereich befindet. Ausnahme ist das native AGP von *Ginkgo biloba*. Bei dem ersten Peak aller Proben handelt es sich sehr wahrscheinlich um Aggregate, welches deutlich im Vergleich zu den AGPs an den sehr großen Molekulargewichten zu erkennen



ist. Bei den dritten Peaks handelt es sich sehr wahrscheinlich um Salzpeaks oder um Verunreinigungen der AGPs, wie z.B. oligomere Zucker. Für eine Mengenabschätzung der drei Peaks wurde das konzentrationsabhängige RI-Signal zur Auswertung genutzt, da der MALLS-Detektor konzentrationsunabhängig sensibler auf große Moleküle reagiert, welches sich in den hohen Unwahrscheinlichkeiten der Molekulargewichte der dritten Peaks zeigt. Wie bereits oben aufgeführt, wurde das hydrodynamische Volumen über eine Kalibriergerade von drei Pullulanstandards errechnet, deren Molekulargewicht vorlagen.

Sehr auffällig ist das große Molekulargewicht des *Ginkgo biloba*s AGPs mit einer Größe von 520,4 kDa (hydrodynamisches Volumen: 58,0 kDa). Das Molekulargewicht des *Ephedra distachya* AGPs beträgt 132,6 kDa (hydrodynamisches Volumen: 47,5 kDa) und jenes des *Cycas revoluta* AGPs 180,9 kDa (hydrodynamisches Volumen: 77,6 kDa). Damit liegen die Molekulargewichte im typischen Größenbereich für AGPs. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die AGPs im Vergleich der absoluten Molekulargewichte im Vergleich zum geringeren hydrodynamischen Volumen eine verzweigte Struktur aufweisen.

Das AGP<sub>Oxal</sub> von *Ginkgo biloba* besitzt mit einer prozentualen Abnahme von -75,0% im Vergleich zum nativen AGP ein Molekulargewicht von 129,9 kDa (hydrodynamisches Volumen: 10,2 kDa), das AGP<sub>Alk</sub> mit einer Abnahme von -68,6% ein Molekulargewicht von 163,5 kDa (hydrodynamisches Volumen: 43,8 kDa) und das AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> mit einer Abnahme von -96,2% ein absolutes Molekulargewicht von 19,9 kDa (hydrodynamisches Volumen: 8,6 kDa).

Wie erwartet, wurden die Molekulargewichte der chemisch behandelten AGPs im Vergleich zum nativen AGP in Abhängigkeit der genutzten Methode deutlich kleiner. Das hydrodynamische Volumen ist dabei weiterhin im Vergleich zum absoluten Molekulargewicht gering geblieben. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass trotz der Abspaltungsprozesse das Molekül weiterhin verzweigt geblieben ist.

## 3.2. Bindung von AGPs an Antikörper und Interaktionsstudien mit humanen Galektinen

### 3.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um zu überprüfen, welche Epitope die AGPs von *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* aufweisen, wurden mehrere indirekte ELISAs mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Für die Versuche wurden die Antikörper JIM 13, MAC 207 und KM 1 eingesetzt, bei welchen es sich um Antikörper handelt, die typische AGPs der Angiospermen erkennen. Die Antikörper LM 2 und LM 6 erkennen typische Bausteine von Angiospermen AGPs. Da das *Ginkgo*-AGP einzigartige AG-Strukturmerkmale vom Typ I aufweist, wurden zur Überprüfung die Antikörper LM 5 und LM 26 eingesetzt. Um eine möglichst große Vielfalt AGPs zu testen, wurden zusätzlich das AGP<sub>Oxal</sub>, das AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> sowie das AGP<sub>Uron</sub> von *Ginkgo biloba* eingesetzt. Als Positivprobe wurde bei dem indirekten ELISA mit dem Antikörper KM 1 das AGP aus dem gewonnenen Presssaft von *Echinacea purpurea* eingesetzt (Classen *et al.*, 2004).

Je Platte wurde eine Konzentrationsreihe von 2,5 µg/ml bis 50 µg/ml erstellt. Nach Zugabe des Substrates Nitrophenylphosphat entstand ein Farbkomplex, welcher bei 558 nm photometrisch vermessen werden konnte. Abhängig von der Plattenkapazität wurde eine Dreifachbestimmung der Absorptionswerte ermittelt, wobei von diesen der gemittelte Blindwert abgezogen wurde. Die Konzentration 0 µg/ml zeigt den ermittelten Blindwert der jeweiligen Messung.

### 3.2.1.1. ELISA-Versuche mit den Gymnospermen-AGPs

Nachfolgend sind die Diagramme (siehe Abbildung 35) der Reaktivitäten der genutzten Antikörper abgebildet, welche mit den eingesetzten AGPs ermittelt werden konnten.

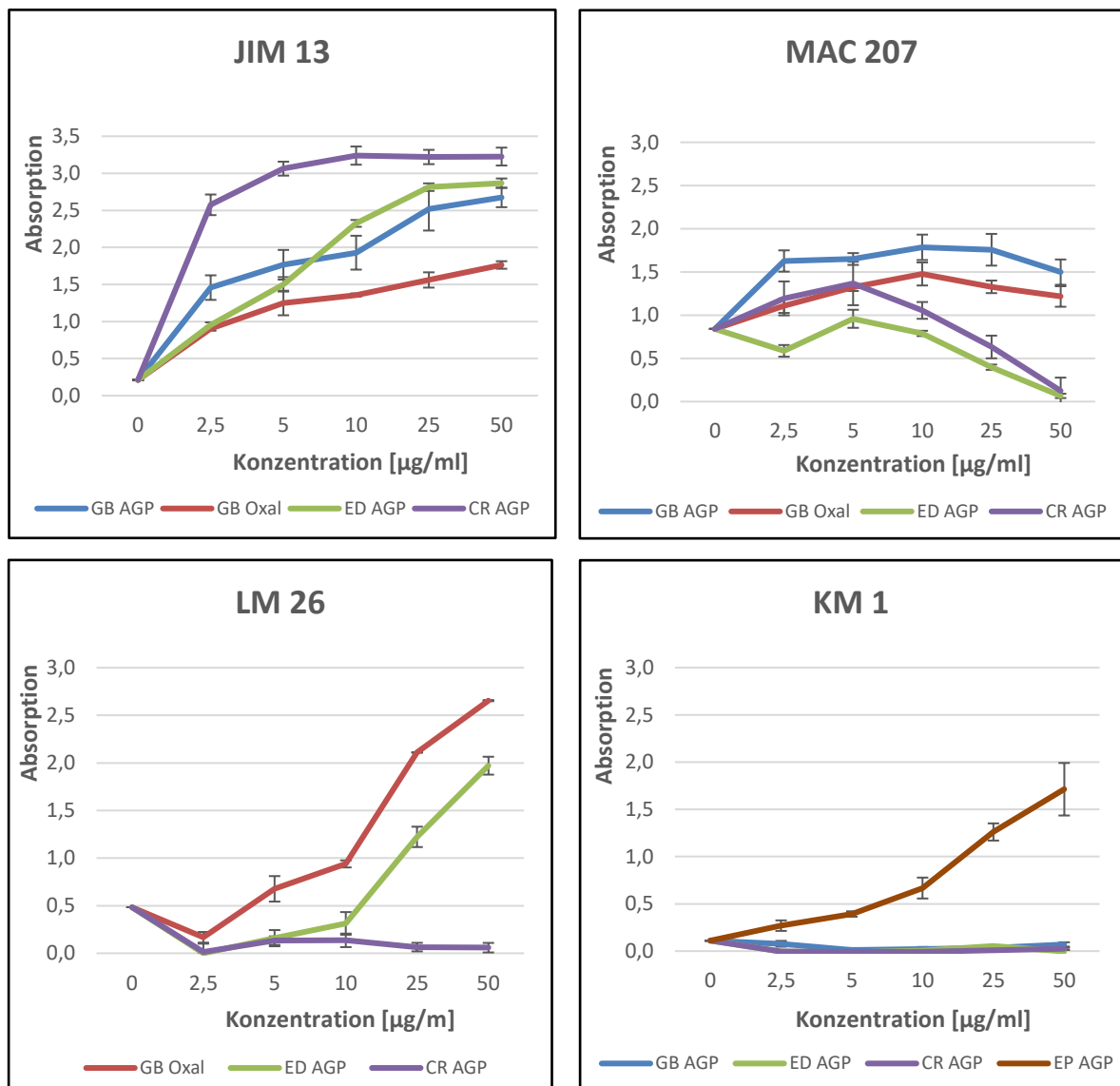


Abbildung 35: ELISA-Diagramme über die Reaktivität der genutzten Antikörper 1

A: JIM 13, B: MAC 207, C: LM 26 und D: KM 1

AGPs: GB AGP: *Ginkgo biloba* AGP, CR AGP: *Cycas revoluta* AGP, ED AGP: *Ephedra distachya* AGP, GB Oxal: Oxalsäure hydrolysiertes *Ginkgo biloba* AGP, EP AGP: *Echinacea purpurea* AGP (Presssaft)

**JIM 13 (Epitop:  $\beta$ -D-GlcAp-(1→3)- $\alpha$ -D-GalAp-(1→2)- $\alpha$ -L-Rha)**

Der Antikörper JIM 13, der zahlreiche typische AGPs erkennt, zeigt die höchste Reaktivität zu dem *Cycas revoluta* AGP, obwohl die kolorimetrische Uronsäurebestimmung mit 6,6% (m/m) den niedrigsten Gehalt aller eingesetzten nativen Gymnospermen-AGPs aufweist. Die AGPs von *Ginkgo biloba* und *Ephedra distachya* weisen ähnliche Absorptionswerte auf, das *Ginkgo biloba* AGP<sub>Oxal</sub> die geringsten. Bei letzterem wurde aufgrund der Abspaltung von Arabinosen eine deutlich stärkere Absorption erwartet. Der Gehalt an Uronsäuren scheint hierbei keinen Einfluss auf die Reaktivität von JIM 13 zu haben. Andere Faktoren wie eine sterische Hinderung durch einen niedrigen Verzweigungsgrad müssen hierbei ebenso in Betracht gezogen werden.

**MAC 207 (Epitop:  $\beta$ -D-GlcAp-(1→3)- $\alpha$ -D-GalAp-(1→2)- $\alpha$ -L-Rha)**

Der Antikörper MAC 207, ebenfalls ein AGP typischer AGP-Antikörper zeigt zunächst bei allen AGPs einen Anstieg und ab ca. 5 bis 10  $\mu$ g/ml einen leichten Abfall. Das *Ginkgo biloba* AGP zeigt die höchsten Absorptionswerte, das *Ginkgo biloba* AGP<sub>Oxal</sub> leicht niedrigere. Die AGPs von *Cycas revoluta* und *Ephedra distachya* zeigen die geringsten Absorptionswerte, wobei bei diesen zusätzlich der stärkste Abfall ab 5  $\mu$ g/ml zu beobachten ist. Laut Literaturangaben sollen sowohl JIM 13 als auch MAC 207 an die gleichen Epitope binden, was jedoch aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten zu den eingesetzten AGPs nicht bestätigt werden konnte.

**KM 1 (Epitope: (1→6)- $\beta$ -D-Galp Einheiten in AGs Typ II)**

Die geringe Konzentration von 1,6-Galp zeigt sich in einer kaum vorhandenen Bindungsaffinität von KM 1 zu allen drei nativen AGPs. Das AGP von *Echinacea purpurea* zeigt wie erwartet einen gleichmäßigen Anstieg der Absorptionswerte.

**LM 26 (Epitop: (1,6-Gal)-Verknüpfung in (1,4-Gal)- $\beta$ -D-Galactan)**

Aufgrund der hohen Mengen an 1,4-verknüpfter Galactose im *Ginkgo*-AGP wurde der Antikörper LM 26 getestet. Reaktivität abhängig vom Gehalt an 1,4-Galp. Die Reaktivität ist besonders hoch bei dem *Ginkgo biloba* AGP<sub>Oxal</sub>.

### 3.2.1.2. ELISA-Versuche mit dem nativen und den behandelten *Ginkgo*-AGPs

Nachfolgend sind die Diagramme der Reaktivitäten von unterschiedlichen Antikörpern mit diversen *Ginkgo biloba* AGPs dargestellt (siehe Abbildung 36).

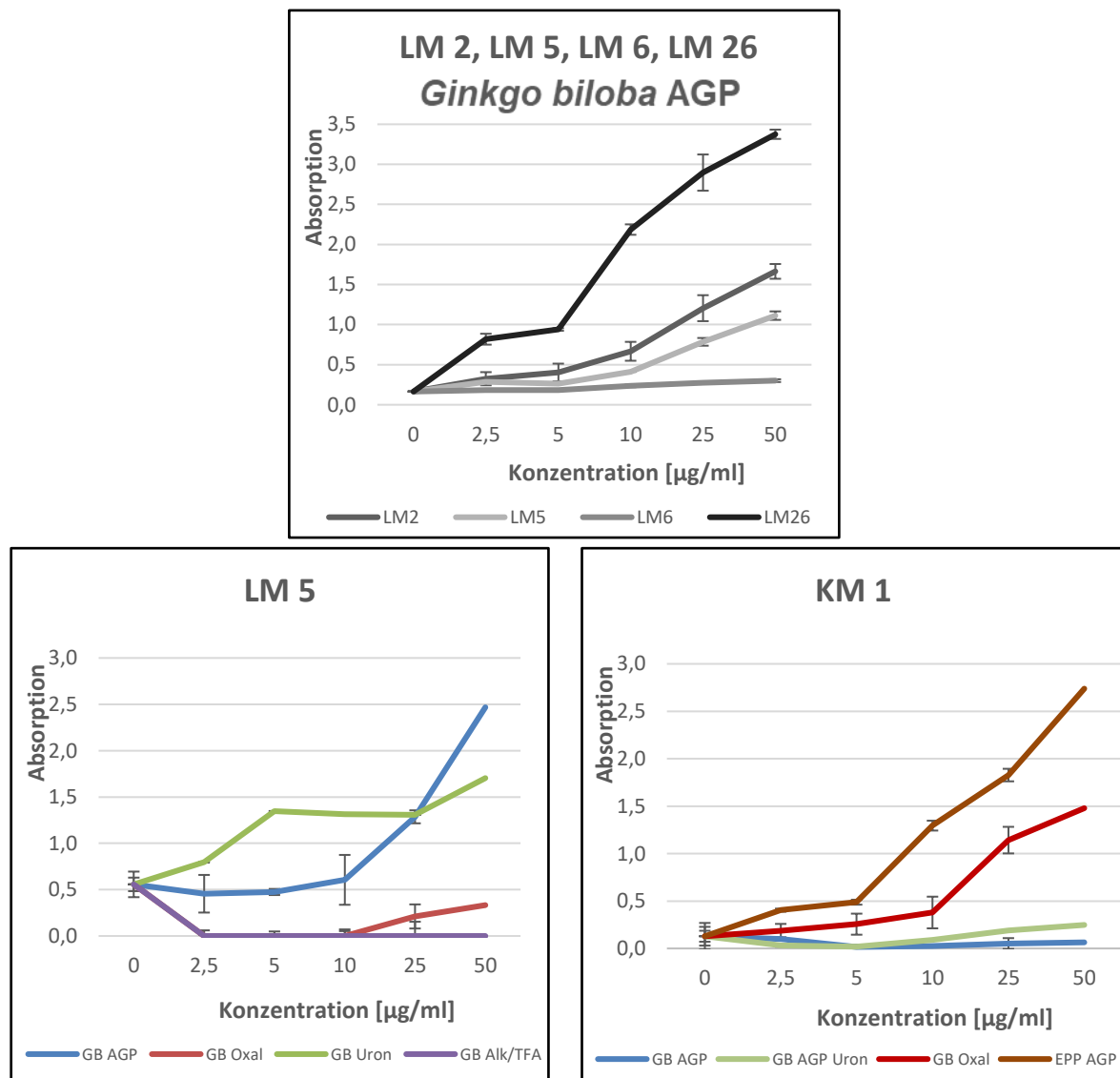


Abbildung 36: Diagramme über die Reaktivität der genutzten Antikörper 2

Antikörper: LM 2, LM 5, LM 6, LM 26 und KM 1 mit unterschiedlichen *Ginkgo* AGP-Proben

AGPs: GB AGP: *Ginkgo biloba* AGP, GB Oxal: Oxalsäure hydrolysiertes *Ginkgo biloba* AGP, GB Uron: Uronsäurereduziertes *Ginkgo biloba* AGP, GB Alk/TFA: Alkalisch/TFA 0,2 hydrolysiertes *Ginkgo biloba* AGP, EPP AGP: *Echinacea purpurea* AGP (Presssaft)

**LM 2 (Epitop: (1→6)-β-D-Galp Einheiten mit terminaler β-D-GlcAp im AGP)**

Die Reaktivität von LM 2 zeigt sich mäßig stark. Die Bindung bestätigt das Vorhandensein von Glucuronsäure-haltigen Epitopen.

**LM 5 (Epitop: [(1→4)-β-D-Gal]<sub>3</sub>)**

Die Bindungsaffinität von LM 5 bestätigt das Vorkommen von 1,4-Galp aus der Bindungs-typanalyse, welches jedoch möglicherweise aufgrund von sterischen Hinderungen geringer als erwartet ausfiel. LM 5 zeigt die höchste Reaktivität zu dem nativen *Ginkgo biloba* AGP, bei welchem die Absorptionswerte bei steigender Epitopenkonzentration ansteigen. Das AGP<sub>Uron</sub> zeigt eine ungleichmäßige Steigung der Absorptionswerte. Das AGP<sub>Oxal</sub> zeigt hingegen der Erwartungen ab einer Konzentration von 10 µg/ml nur leicht erhöhte Absorptionswerte. Bei dem AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> konnten keine Werte gemessen werden. Dieses lässt die Vermutung zu, dass der Großteil der 1,4-Galp-Einheiten bei dieser Hydrolyse zerstört worden sind.

**LM 6 (Epitop: (1,5)-α-L-Araf im Arabinan/AGP)**

Der Antikörper LM 6 zeigt nur eine sehr schwache Bindung an das native *Ginkgo biloba* AGP. Durch sterische Hinderungen von langen 1,4-Galp-Ketten könnte eine mögliche Bindung vermindert sein.

**LM 26: Epitop: (1,6-Galp)-Verknüpfung in (1,4-Galp)-β-D-Galactan**

Das native *Ginkgo biloba* AGP zeigt die höchsten Absorptionswerte mit LM 26. Die starke Bindung an das native und das Oxalsäure hydrolysierte *Ginkgo*-AGP ist sehr verwunderlich, da eine solche Verzweigung im *Ginkgo*-AGP nicht nachgewiesen werden konnte.

**KM 1: (Epitope: (1→6)-β-D-Galp Einheiten in AGs Typ II)**

Der Antikörper KM 1 zeigt erneut die höchsten Werte bei dem AGP von *Echinacea purpurea*. Das *Ginkgo*-AGP<sub>Oxal</sub> zeigt nachfolgend die höchsten Werte, welches in einer Freilegung der 1,6-Galp-Einheiten durch die milde Säurehydrolyse begründet werden kann. Das AGP<sub>Nativ</sub> sowie das AGP<sub>Uron</sub> zeigen hingegen kaum eine Reaktion.

### 3.2.2. Zellfreie Expression von Galektin-1

Nach der Isolierung der Plasmid DNA aus kompetenten *E. coli* Bakterien (2.3.2.1.-2.3.2.7.), wurde eine zellfreie Expression im präparativen Maßstab durchgeführt (2.3.2.8.). Nach einer Aufreinigung durch eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Affinitätschromatographie (2.3.2.9.) wurden die Elutionsfraktionen für eine SDS-Page verwendet (2.3.2.10.) und mittels Coomassiefärbung nachbehandelt (2.3.2.11.). Nachfolgend ist beispielhaft das Gel der SDS-Page der Suspensionsfraktion nach der Coomassiefärbung dargestellt (siehe Abbildung 37).

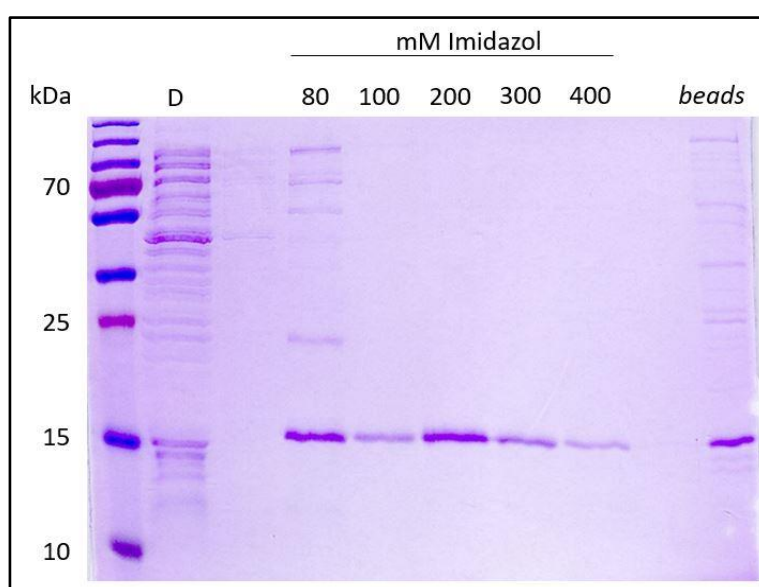


Abbildung 37: Elutionsprofil des unbehandelten Suspensionsansatzes von Galektin-1 in einem Coomassie-Gel gefärbten SDS-Gel.

D =Durchfluss, beads =  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose *beads*

Der unbehandelte Suspensionsansatz zeigte hohe Konzentrationen des Proteins bei der Markergröße von 15 kDa in allen Elutionsstufen. Zusätzlich konnte eine höhere Konzentration auf den *beads* festgestellt werden, woraus ersichtlich ist, dass die gesamte Proteinkonzentration nicht vollständig eluiert werden konnte. Nach dem Vereinen der Elutionsstufen wurde ein Westernblot durchgeführt (2.3.2.15.), welcher nachfolgend abgebildet ist (siehe Abbildung 38) und der belegt, dass das Galektin-1 erfolgreich zellfrei exprimiert werden konnte.

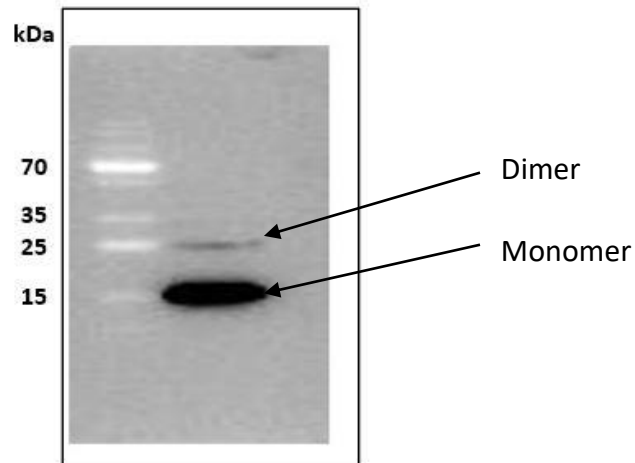


Abbildung 38: Darstellung des Westernblots des zellfrei exprimierten Galektin-1

Die Molekulargröße des Monomers kann auf ca. 14-15 kDa geschätzt werden. Das Dimer liegt entsprechend bei ca. 26 kDa. Die anschließende Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz (2.3.2.13.) ergab eine Konzentration für den unbehandelten Suspensionsansatz von 147  $\mu\text{g/ml}$  (Gesamtausbeute: 244  $\mu\text{g/ml}$ ). Dieser Konzentration wurde als Richtwert für die nachfolgende Interaktionsmessung zwischen mit alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten AGP von *Echinacea pupurea* mittels BLI genutzt.

### 3.2.3. Interaktionsstudien von AGPs mit humanen Galektinen am BLI

Für die Bestimmung der Konstanten, welche die Reaktionskinetik beschreiben, zwischen den durch Biotinylierung an SA-Sensoren immobilisierten gekauften Galektin-3 bzw. zellfrei exprimierten Galektin-1 mit unterschiedlichen AGP-Proben wurde die Bio-Layer-Interferometrie angewendet. Nachfolgend sollen die einzelnen Interaktionsstudien dargestellt werden.



### 3.2.3.1. Interaktionsstudien mit Galektin-3

Für die erste Interaktionsstudie mit dem Galektin-3 wurde das native *Ginkgo biloba* AGP, das AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> sowie das AGP<sub>Oxal</sub> in jeweils einer Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt. Zusätzlich wurde für jede Probe ein entsprechender Referenzsensor ohne Galektinbeladung eingesetzt, um das Maß der unspezifischen Bindung der AGP-Probe an den Sensor erkennbar zu machen. Da hier jeweils nur eine Konzentration der jeweiligen Proben eingesetzt wurden, war die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten nicht verlässlich. Es sollen hier lediglich die Tendenzen der Bindungsaffinität zwischen Galektin-3 und diesen AGP-Proben aufgezeigt werden. Nachfolgend ist das gesamte Sensorgramm der Messung dargestellt (siehe Abbildung 39).

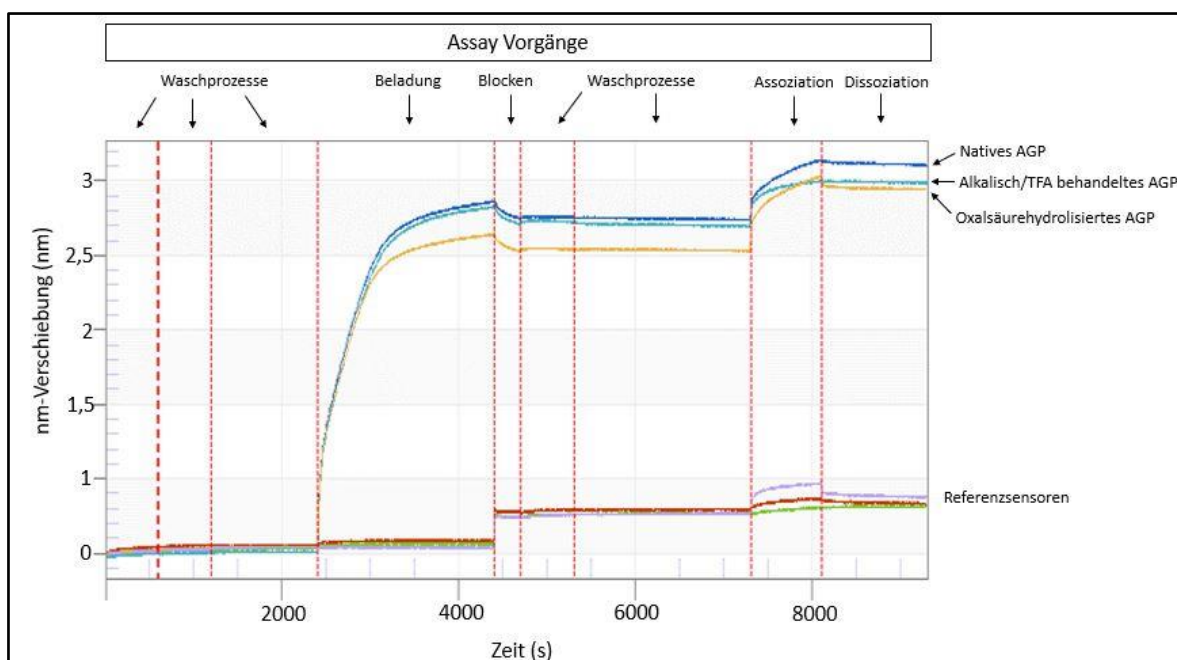


Abbildung 39: BLI-Sensorgramm von Galektin-3 mit diversen AGP-Proben von *Ginkgo biloba*

Die Beladung an die Streptavidin-Sensoren mit Galektin-3 erfolgte mit einer Verschiebung zwischen 2,5 nm und 3 nm nahezu gleichmäßig. Nach dem Wechsel in den Block-Vorgang mit Biocytin war eine leichte Abnahme des Sensorsignal zu beobachten. In den nachfolgenden Waschschritten blieb die nm-Verschiebung nahezu auf einem Plateau. Es zeigten sich deutliche Assoziationen aller eingesetzten AGP-Proben mit dem Galektin-3 sowie eine kaum vorhandene Dissoziation, welches vermuten lässt, dass eine starke Affinität vorliegt. Die eingesetzten Referenzsensoren zeigten keine Beladung mit Galektin-3, allerdings eine

schwache unspezifische Bindung der AGP-Proben an die Streptavidin-Sensoren. Für die Auswertung wurden die Signale der unspezifischen Bindung von den ermittelten Signalen der Interaktionsmessung mittels der *Octet System Data Analysis Software* abgezogen. Nachfolgend ist das Sensorgramm der einzelnen Assoziationen und Dissoziationen der AGP-Proben dargestellt (siehe Abbildung 40).

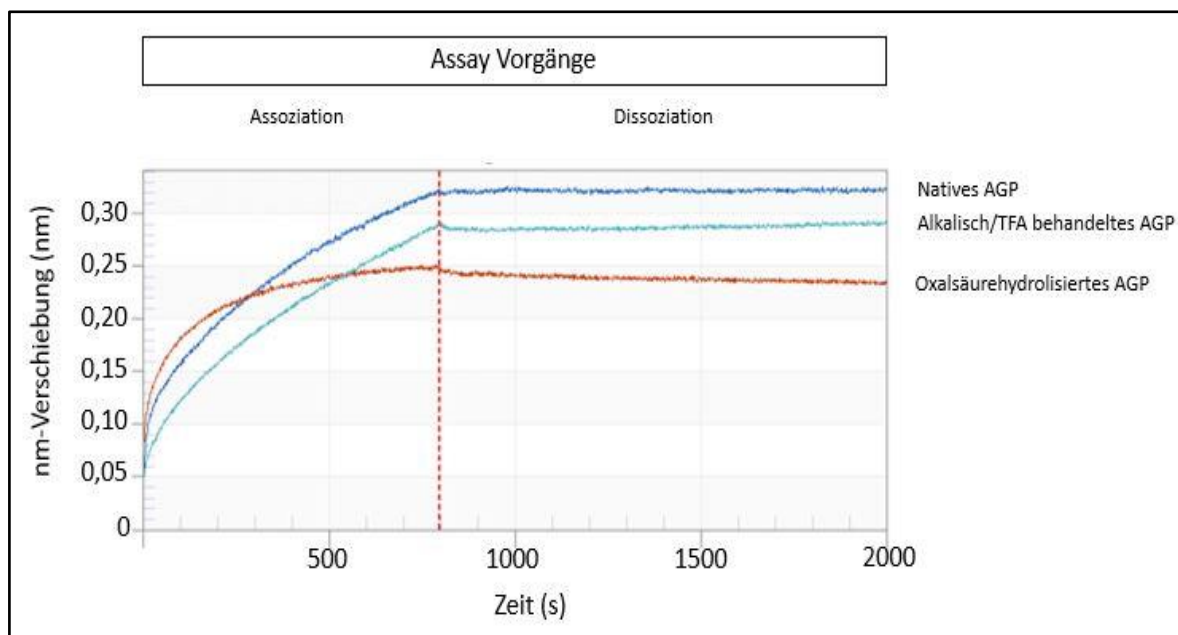


Abbildung 40: BLI-Sensorgramm der Assoziationen und der Dissoziationen von Galektin-3 mit diversen AGP-Proben

Die stärkste Assoziation zwischen dem Galektin-3 mit einer Verschiebung von über 0,30 nm war bei dem nativen AGP zu beobachten. Mit ca. 0,27 nm war die Assoziation des  $\text{AGP}_{\text{Alk/TFA } 0,2}$  leicht schwächer und mit ca. 0,24 nm war die Assoziation des  $\text{AGP}_{\text{Oxal}}$  am schwächsten. Da die Assoziation des  $\text{AGP}_{\text{Nativ}}$  und dem  $\text{AGP}_{\text{Alk/TFA } 0,2}$  noch keine Tendenz eines Plateaus zeigt, ist davon auszugehen, dass die nm-Verschiebung noch höher liegt. Alle drei Proben zeigten kaum eine Dissoziationskurve.

Für die zweite kinetische Interaktionsstudie wurde das  $\text{AGP}_{\text{Alk/Oxal}}$  von *Ginkgo biloba* in den fünf unterschiedlichen Konzentrationen 0,8, 2,0, 4,0, 8,0 und 16,0  $\mu\text{M}$  mit Galektin-3 eingesetzt. Zusätzlich wurde einmalig ein Referenzsensor ohne Galektinbeladung eingesetzt,

der in eine AGP-Probe mit der Konzentration von  $8,0\ \mu\text{M}$  taucht, um das Maß einer unspezifischen Bindung an den Sensor zu detektieren. Nachfolgend ist das gesamte Sensorgramm der Interaktionsmessung dargestellt (siehe Abbildung 41).

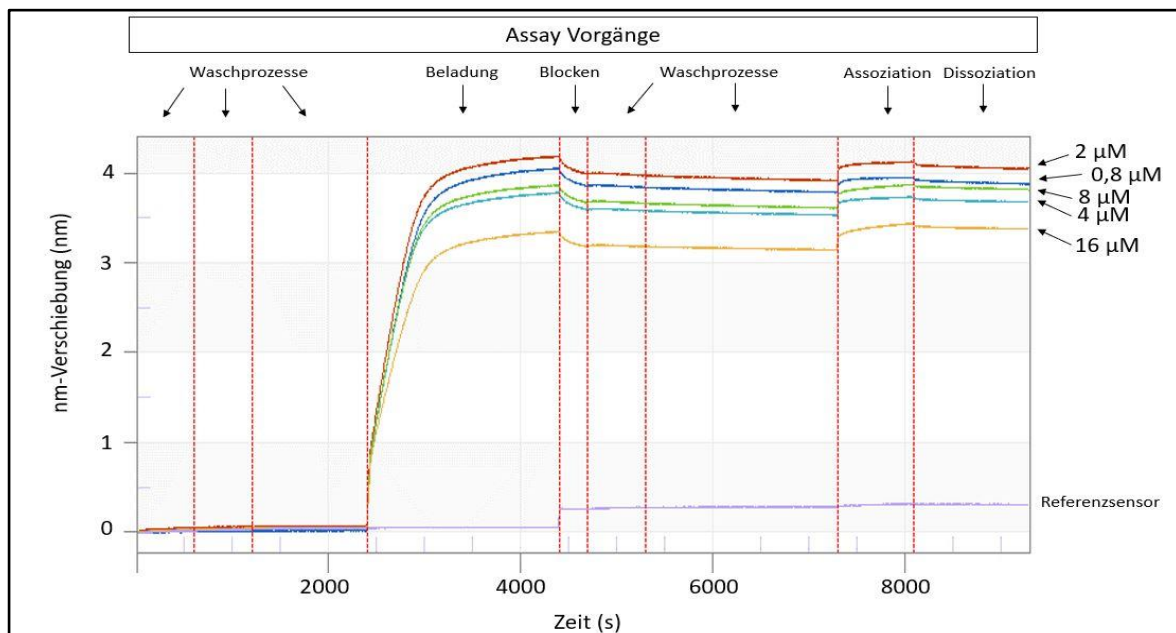


Abbildung 41: Bli-Sensorgramm von Galektin-3 mit dem alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten AGP von *Ginkgo biloba*

Die Galektin-3 Beladung an die Streptavidin-Sensoren erfolgte mit einer Verschiebung zwischen  $3,2\ \text{nm}$  und  $4,2\ \text{nm}$ . Wie auch in den vorherig durchgeführten Versuchen war nach dem Wechsel in den Block-Vorgang ein leichter Abfall des Sensorsignals des gebundenen Galektin-3 zu beobachten. In den nachfolgenden Waschschritten blieb die Beladung nahezu auf einem Plateau. Weiterhin konnten bei allen genutzten AGP-Konzentrationen deutliche Assoziationen an das Galektin-3 sowie geringes Maß an Dissoziation beobachtet werden, welches ebenso auf eine hohe Affinität schließen lässt. Der eingesetzte Referenzsensor zeigte keine Beladung mit Galektin-3 und ebenso kaum eine Assoziation der AGP-Probe an den Leersensor. Das erhaltene Signal wurde auch hier von den ermittelten Signalen der Interaktionsmessung zwischen dem Galektin-3 und den AGP-Proben mittels der *Octet System Data Analysis Software* abgezogen. Nachfolgend ist das Sensorgramm der einzelnen Assoziationen und Dissoziationen der AGP-Probe dargestellt (siehe Abbildung 42). Die roten Linien stellen die Regressionskurven des *Fittings* dar.

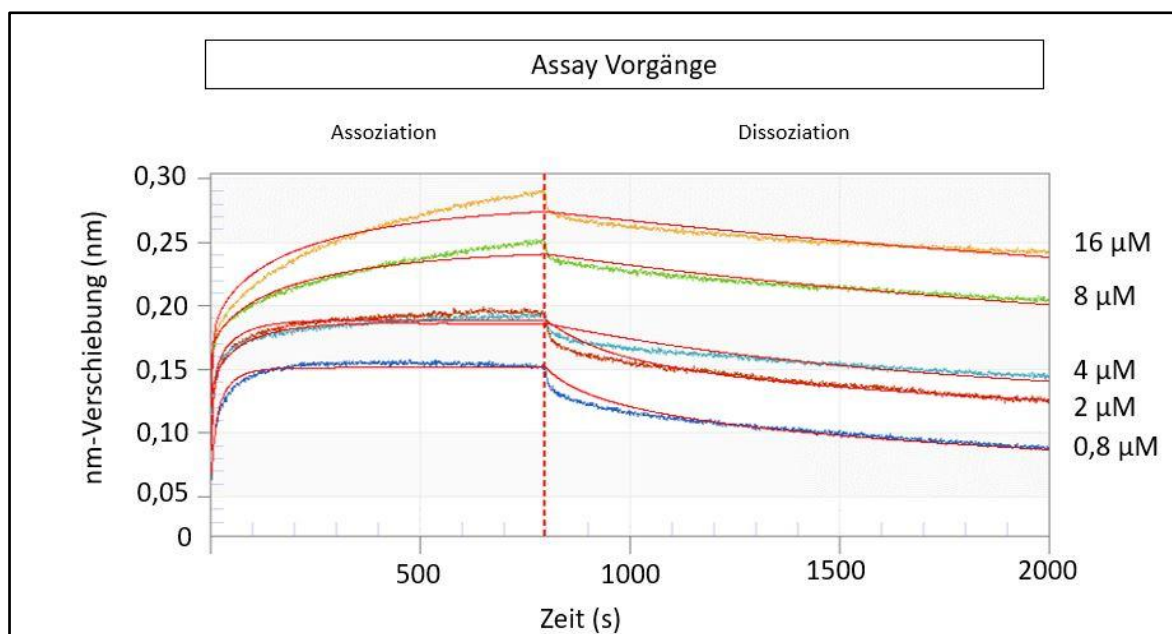


Abbildung 42: BLI-Sensorgramm der Assoziationen und Dissoziationen von Galektin-3 mit dem alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten AGP von *Ginkgo bilba*

Die Assoziationen steigen konzentrationsabhängig auf maximal ca. 0,29 nm an, wohingegen anzunehmen ist, dass die Assoziationen der Konzentrationen von 8 µM und 16 µM bei längerer Zeitvorgabe noch weiter angestiegen wären. Die Assoziationen der Konzentrationen von 0,8, 2 und 4 µM lassen innerhalb der gemessenen Zeit ein Plateau vermuten. Bei allen fünf Konzentrationen war eine leichte Dissoziation zu beobachten. Für die Messung konnten folgende Geschwindigkeitskonstanten ermittelt werden (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Mit dem BLI ermittelte Geschwindigkeitskonstanten der Interaktion zwischen Galektin-3 und dem alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten *Ginkgo biloba* AGP

$K_D$ (M)	$K_D$ -Fehler (M)	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_a$ -Fehler ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$k_d$ -Fehler ( $s^{-1}$ )	$R^2$
$1,06 \times 10^{-7}$	$1,01 \times 10^{-8}$	$2,48 \times 10^{+4}$	$9,17 \times 10^{+2}$	$2,14 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-4}$	0,944

Die Fehler des vom Programm errechneten  $k_d$ -Wertes und des  $k_a$ -Wertes lagen bei 6,4% bzw. bei 3,7%. Der  $K_D$ -Wert für Galektin-3 und das *Ginkgo biloba* AGP<sub>Alk/Oxal</sub> beträgt 0,106 µM mit einem Fehler von 9,5%. Der  $R^2$ -Wert nimmt beim *bivalenten Fitting* mit 0,944 einen annehmbaren Wert ein. Ein *1:1 Fitting* ergab einen  $R^2$ -Wert von 0,734.

### 3.2.3.2. Interaktionsstudien mit dem zellfrei exprimierten Galektin-1

Für die dritte Interaktionsstudie wurde das im Arbeitskreis vorhandenen alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten AGP von *Echinacea purpurea* (AGP<sub>Alk/Oxal</sub>) mit einer per GPC ermittelten Molekulargröße von 25,7 kDa in den drei unterschiedlichen Konzentrationen von 5, 10 und 20 µM zur Interaktionsbestimmung mit dem biotinylierten Galektin-1 eingesetzt. Zusätzlich wurde einmalig ein Referenzsensor, der in eine AGP-Probe mit der Konzentration von 10 µM eintaucht. Nachfolgend ist das gesamte Sensorgramm der Messung dargestellt (siehe Abbildung 43).

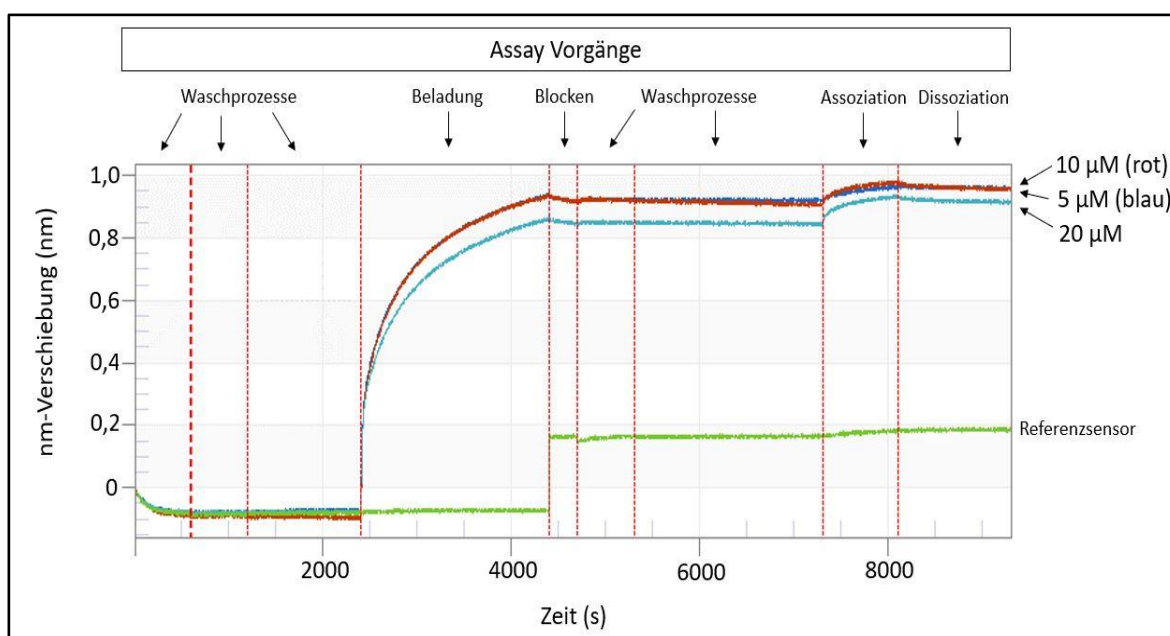


Abbildung 43: BIA-Sensorgramm des zellfrei exprimierten Galektin-1 mit dem alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten AGP von *Echinacea purpurea*

Die Beladung an die Streptavidin-Sensoren von Galektin-1 erfolgte gleichmäßig bis ca. 0,9 nm. Wie in allen vorherigen Versuchen war nach dem Wechsel in die Blockkavität ein nur leichter Abfall bei Beladungsmenge vom gebundenen Galektin-1 zu beobachten. In den nachfolgenden Waschschritten blieb diese Bindung auch nahezu auf einem Plateau. Weiterhin konnten bei allen eingesetzten AGP-Konzentrationen Assoziationen der AGP-Probe an das Galektin-1 sowie geringe Dissoziationen beobachtet werden. Der eingesetzte Referenzsensor zeigte eine sehr geringe Assoziation der AGP-Probe. Auch hier wurde das erhaltene Signal von den ermittelten Signalen der Interaktionsmessung zwischen dem Galektin-

1 und den AGP-Proben mittels der *Octet System Data Analysis Software* abgezogen. Nachfolgend ist das Sensorgramm der einzelnen konzentrationsabhängigen Assoziationen und Dissoziationen der AGP-Probe an das Galektin-1 dargestellt (siehe Abbildung 44). Die roten Linien stellen die Regressionskurven des *1:1 Fittings* dar.

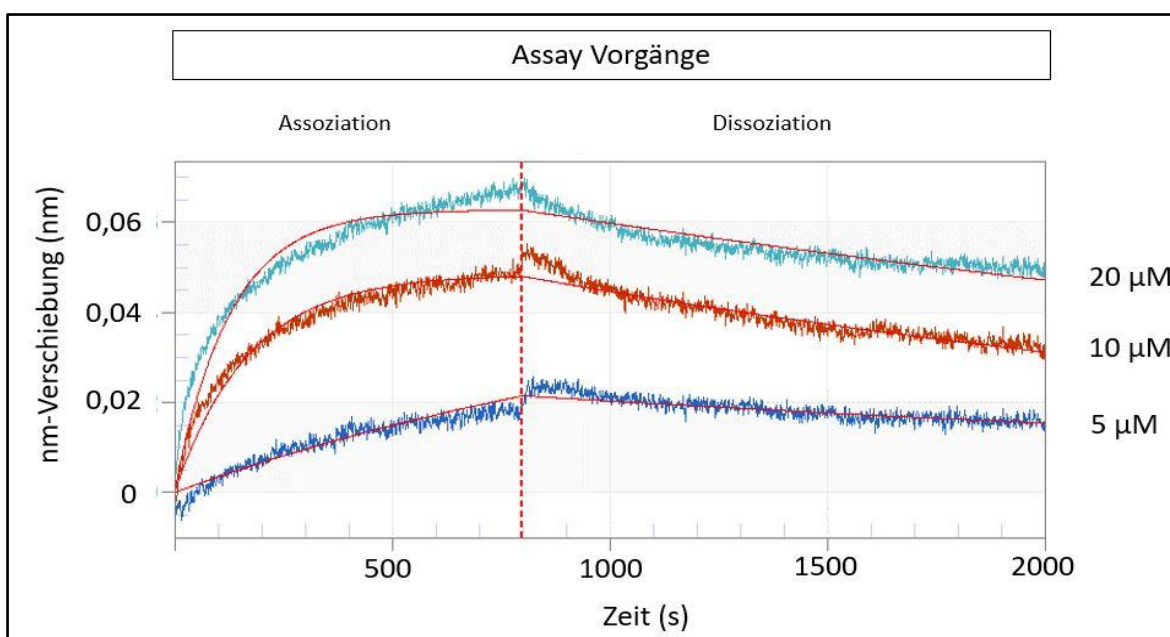


Abbildung 44: BLI-Sensorgramm der Assoziationen und Dissoziationen von Galektin-1 mit dem alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten AGP von *Echinacea purpurea*

Die Assoziationen steigen wie erwartet konzentrationsabhängig unterschiedlich an, jedoch lag die maximale nm-Verschiebung der höchsten Assoziation nur leicht über 0,06 nm. Da die Methodenoptimierung viele Monate in Anspruch genommen hat, besteht hier die Möglichkeit, dass das Galektin aufgrund der langen Zeit im gefrorenen Zustand an Aktivität verloren hat oder durch die zellfreie Expression zu wenig korrekte Bindungsdomänen für die Interaktion gebildet worden sind. Die Dissoziationskurven waren bei allen drei Konzentrationen gering. Für diese Messung konnten folgende Geschwindigkeitskonstanten ermittelt werden (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Mit dem BLI ermittelte Geschwindigkeitskonstanten der Interaktionsmessung zwischen dem zellfrei exprimierten Galektin-1 und dem alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten AGP von *Echinacea purpurea*

<b>K<sub>D</sub></b> <b>(M)</b>	<b>K<sub>D</sub>-Fehler</b> <b>(M)</b>	<b>k<sub>a</sub></b> <b>(M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>k<sub>a</sub>-Fehler</b> <b>(M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>k<sub>d</sub></b> <b>(s<sup>-1</sup>)</b>	<b>k<sub>d</sub>-Fehler</b> <b>(s<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
1,41x10 <sup>-6</sup>	1,03x10 <sup>-7</sup>	3,41x10 <sup>+2</sup>	5,56x10	2,91x10 <sup>-4</sup>	4,09x10 <sup>-6</sup>	0,932

Die Fehler des vom Programm errechneten k<sub>d</sub>-Wertes und des k<sub>a</sub>-Wertes lagen bei 16,3% bzw. bei 1,4%. Der K<sub>D</sub>-Wert für das zellfrei exprimierte Galektin-1 und dem alkalisch und Oxalsäure hydrolysierten *Echinacea purpurea* AGP beträgt 1,41 µM mit einem Fehler von 7,3%. Der R<sup>2</sup>-Wert nimmt beim 1:1 Fitting mit 0,932 einen annehmbaren Wert ein.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Isolierung und Charakterisierung der Gymnospermen-AGPs

#### 4.1.1. Evolutionärer Hintergrund der Gymnospermen

Embryophyten (Landpflanzen) entstanden vor ca. 470 Millionen Jahren und hatten ihren Ursprung im Wasser, wobei sie sich wahrscheinlich aus der Klasse der Charophyten aufgrund der Anpassungsmöglichkeiten an die Umwelt entwickelten. Zusammen bilden die Charophyten mit den Landpflanzen die Gruppe der Streptophyten, die als Schwestern-Gruppe der Grünalgen, der Chlorophyten, angesehen werden.

Im Zeitalter des Karbons, vor ca. 300 Millionen Jahren, bestand der Großteil der Pflanzenwelt aus Farnen, welche nach und nach von den Gymnospermen verdrängt worden sind. Diese Pflanzengruppe dominierte das Zeitalter des Perms und der späten Kreidezeit, also vor 260 bis 70 Millionen Jahren, bis sie ab der späten Kreidezeit vor 100 bis 65 Millionen Jahren langsam von den Angiospermen, der bis heute dominierenden Gruppe der Pflanzen, abgelöst wurden (Pires & Doland, 2012).

Während des Känozikums, vor ca. 66 Millionen Jahren, konnten sich die Gymnospermen im Gegensatz zu den Angiospermen nicht optimal an die veränderten klimatischen Veränderungen der Erde anpassen. Insbesondere in der südlichen Hemisphäre war eine schnelle Anpassung erforderlich. In der nördlichen Hemisphäre sind Arten vorzufinden, die besser an kühlere und trockenere Bedingungen angepasst waren. Dieses zeigt sich auch in einer höheren Artenvielfalt der Pinaceae und Cupressaceae verglichen zur südlichen Hemisphäre (De La Torre *et al.*, 2019). Die Angiospermen bilden mit Abstand die vielfältigste Gruppe der Pflanzenwelt und umfassen 250 000 (Aoki *et al.*, 2004) bis 300 000 Arten (Lengyel *et al.*, 2009), wohingegen die Gruppe der Gymnospermen nur noch 1 000 rezente Arten umfasst (De La Torre *et al.*, 2019).



#### 4.1.2. Isolierung und Charakterisierung der HMFs

Nach der Zerkleinerung des getrockneten Drogenmaterials wurde eine zweimalig durchgeführte Aceton-Extraktion durchgeführt, um Polyphenole und Gerbstoffe zu entfernen. Im Anschluss konnten hydrophile Glykoproteine und Polysaccharide mittels Wasserextraktion extrahiert werden. Die Extrakte zeigten bei allen Proben nach der Entfernung der Feststoffe eine leicht gebliche, dennoch sehr klare Farbe. Um eine Denaturierung der nicht- oder schwach glykosylierten Proteine zu ermöglichen, wurde die Extrakte auf 90°C erhitzt, wobei der Kohlenhydratanteil den deutlich kleineren kovalent gebundenen Proteinanteil vor einer Denaturierung schützt. Die denaturierten Proteine sowie restlichen Feststoffbestandteile konnten mittels Zentrifugation entfernt werden. Die durch Gefriertrocknung gewonnenen HMFs zeigten neben einer festen watteartigen Konsistenz eine bräunliche Färbung, welches für das Vorhandensein von noch gebundenen Gerbstoffen bzw. Polyphenolen spricht. Um eine homogene Verteilung zu erlangen, wurden die Fraktionen vorsichtig mit Hilfe eines Mörsers zerrieben.

Die HMF-Auswaagen schwankten zwischen 0,5-1,7%. Die Zuckerausbeuten in der Acetylierung lagen zwischen 17-35%. Für diese geringen Mengen kann es mehrere Erklärungen geben. Ein Grund wäre der Einfluss der mechanischen Zerkleinerung des Probenmaterials. Die Zellwand, Polyphenole und die Polyphenoloxidase (PPO) liegen in unterschiedlichen Kompartimenten vor. Bei der mechanischen Zerkleinerung kommt es zu einer Zerstörung dieser Zellkompartimente und die drei Bestandteile geraten in Kontakt miteinander. So reagieren die Polyphenole durch kovalente oder nichtkovalente Bindung mit der Zellwandmatrix und werden durch die PPO oxidiert und bleiben gebunden (Renard *et al.*, 2017). Weiterhin kann die Ausbeute von der Jahreszeit abhängen, da im Herbst verstärkt Glucose in Form von Stärke eingespeichert wird. Zusätzlich können Zucker, die eine Uronsäure enthalten, sowie die daran gebundenen Zucker in der Acetylierungsanalyse nicht erfasst werden. Anhand der vorliegenden Zuckerausbeuten kann kein jahreszeitlicher Trend der Neutralzuckerzusammensetzungen erkennbar gemacht werden. Hierfür hätten über einen längeren Zeitraum deutlich mehr Proben in den verschiedenen Jahreszeiten analysiert werden müssen. So wäre eine mögliche Erwartung, dass es im Herbst aufgrund der verstärkten Glucosespeicherung in Form von Stärke zu einer höheren Zuckerausbeute als im Sommer kommt.

Bei den untersuchten Gymnospermen-HMFs, mit Ausnahme der von *Ephedra distachya* HMF 1, zeigt sich ein hoher Gehalt an Glucose, welches für ein Vorkommen von Stärke spricht.

Ein hoher Gehalt an Mannose in den HMFs von *Ginkgo biloba* und *Cycas revoluta* deutet auf ein erhöhtes Vorkommen von wasserlöslichen Mannanen hin. Hierbei handelt es sich um Polysaccharide mit Verknüpfung von  $\beta$ -1,4-Mannoseeinheiten (Handford *et al.*, 2003, He *et al.*, 2017). Sie übernehmen in den Pflanzen wichtige Aufgaben wie Strukturergänzung der Zellwand und dienen als Speicherpolysaccharid in den Samen (He *et al.*, 2017). Die Gruppe der Mannane kann in lineare Mannane, Glucomannane, Galactomannane und Galactoglucomannane eingeteilt werden (He *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Kraus (1991) berichtet über eine Strukturaufklärung mittels Wasserextraktion gewonnener Polysaccharide aus den Blättern von *Ginkgo biloba* und konnte 1,2,4-Mannose nachweisen, die an Position 4 mit Rhamnose verknüpft ist. Weiterhin konnten Mannane bereits verstärkt in der ligninreichen Zellwand von einigen Gymnospermen gefunden werden (Handford *et al.*, 2003, Donaldson und Knox, 2012) und scheinen eine wichtige Verknüpfung mit Cellulose einzugehen (Donaldson und Knox, 2012; Busse-Wiecher *et al.*, 2016). So fanden Iwata *et al.* (1998) heraus, dass Glucomanne aus den zwei verschiedenen Gymnospermen *Pinus densiflora* und *Fagus crenata* die höchste Affinität zu bakteriell gewonnener Cellulose haben, gefolgt von Xyloglucanen, Xylanen und Arabinogalactanen. Das Vorkommen unterschiedlich verknüpfter Mannoseeinheiten lässt vermuten, dass Glucomannane auch in *Pinus abies* vorkommen. So berichten Makarova *et al.* (2015) dass sich die Polysaccharidfraktion von *Pinus abies* zu 45% aus einem AG, 45-50% aus einem Galactoglucomannan und 5-10% aus anderen Polysacchariden zusammensetzt. Hingegen besteht die Polysaccharidfraktion von *Pinus sylvestris* neben 80% eines AGs aus 10% Galactoglucomannanen und weniger als 10% aus anderen Polysacchariden.

Rhamnose kommt in der Zellwand in Form von den Pektin-Polysacchariden Homogalacturonan (HG), Xylogalacturonan (XGA), Rhamnogalacturonan I (RG I) und Rhamnogalacturonon II (RG II) vor. HG ist eine lineare, homologe Kette aus  $\alpha$ -1,4-Galacturonsäure. Einige dieser Einheiten sind im *Backbone* an verschiedenen Stellen mit Zuckereinheiten, wie Xylose, verknüpft. Weiterhin können die Galacturon-Einheiten an C-6 methylverestert oder an O-2 bzw. O-3 acetyliert vorliegen (Sénéchal *et al.*, 2014). RG I besteht aus den kontinuierlichen Disaccharideinheiten  $\alpha$ -1,4-Galacturonsäure- $\alpha$ -1,2-Rhamnose. Über 20-80%

der Rhamnoseinheiten im *Backbone* sind mit Seitenketten wie  $\beta$ -1,4-Galactan, Arabinanen und/oder AGs verknüpft. RG II ist ein komplexes, stark verzweigtes Polysaccharid auf Basis von HG, an welches 12 unterschiedlichen Zuckereinheiten gebunden sind (Yoo *et al.*, 2012). XGA besteht aus  $\alpha$ -D-Galacturonsäure, welche an C-3 mit  $\beta$ -D-Xylose verknüpft ist (Zandleven *et al.*, 2012). Pektine übernehmen zahlreiche Funktionen in Pflanzen wie Zellwachstum und Zellentwicklung. Sie sind beteiligt am Ionen-Transport, definieren die Porosität der Zellwand und sind an der Aktivierung des pflanzlichen Immunsystems beteiligt (Gawkowska *et al.*, 2018). Der hohe Gehalt von Rhamnose in den HMFs von *Ginkgo biloba* und *Ephedra distachya* lässt damit auf ein Vorhandensein von Rhamnogalacturonanen schließen. So vermutet Kraus (1991) aufgrund des Vorhandenseins unterschiedlich verknüpfter Monosaccharide wie Galacturonsäure, 1,3,6-Galactose, 1,5-Arabinose, 1,2- und 1,2,4-Rhamnose dass in den Blättern von *Ginkgo biloba* Rhamnogalacturonane vorkommen, an welche AGs gebunden sein können. Weiterhin berichten O'Neill *et al.* (2004) über das Vorhandensein spezifischer Monosaccharidkomponenten von RG II in den Zellwänden von *Ginkgo biloba* und *Ephedra*-Arten. Rhamnose konnte in den HMFs von *Cycas revoluta* und *Encephalartos longifolius* nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse aus der Acetylierungsanalyse der HMFs konnten eine gering vorkommende Konzentration von 3-O-Methyl-Rhamnose (*Acofriose*) in *Ginkgo biloba* sowie *Ephedra distachya* belegen. Weiterhin konnte eine höhere Konzentration in *Encephalartos longifolius* und keine nachweisbare Konzentration in der HMF von *Cycas revoluta* gefunden werden. Denkbar wäre hierbei, dass die evolutionärbedingten Entwicklungsstandorte dieser beider Pflanzen zu einer unterschiedlichen Anpassung der Pektin-Polysaccharidfraktion beigetragen haben. Matsunaga *et al.* (2004) konnten eine Verknüpfung dieses Monosaccharides an die Positionen O-2 und/oder O-3 von Arap in den RG II Seitenketten von Lycophyten und Pteridophyten belegen. Zudem konnte *Acofriose* in den Zellwänden von Bryophyten (Happ und Classen, 2019), Charophyten (Popper und Fry, 2003) und Farnen (Bartels und Classen, 2017) nachgewiesen werden. Bis heute ist seine Funktion nicht eindeutig geklärt, jedoch scheint er *in vitro* eine Rolle bei der Verknüpfung der Dimere von RG II zu spielen. Da dieser Zucker im Laufe der Evolution im RG II verloren gegangen zu sein scheint, ist eine essentielle Funktion fragwürdig (Fu *et al.*, 2007).

Xylose konnte in moderaten Konzentrationen in allen HMFs mit Ausnahme der von *Ginkgo biloba* nachgewiesen werden. Dieses weist evtl. auf ein Vorkommen von wasserlöslichen

Xylanen und Xyloglucanen, welche aus  $\beta$ -1,4-Glucoseketten mit seitlich verknüpften  $\beta$ -1,6-Xyloleinheiten bestehen (Bum Park und Cosgrove, 2014), hin. Diese sind Bestandteile der Hemicellulosen (Broeker *et al.*, 2018). Das *Backbone* der Xylane besteht aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Xyloseeinheiten, an welche Arabinose, Glucuronsäure sowie 4-O-Methylglucuronsäure gebunden vorliegen können (Peralta *et al.*, 2017). Ihre Funktionen sind bislang in Gymnospermen wenig erforscht worden. Busse-Wicher *et al.* (2016) vermuten, dass Xylane an Cellulose binden und konnten sie aus der sekundären Zellwand von verschiedenen Gymnospermen, so auch unter anderem aus *Ginkgo biloba* und *Ephedra major*, analysieren. Es wird vermutet, dass Xylane sowohl in Gymnospermen als auch in Angiospermen aufgrund ihrer Cellulosebindung zu einer Stabilisierung der sekundären Zellwand beitragen (Busse-Wicher *et al.*, 2016).

Für eine umfassendere Beurteilung der Zusammensetzung der HMFs hätten weitere Strukturaufklärungen durchgeführt werden müssen.

Aus dem ethanolhaltigen Überstand der HMF konnte ein Arabinan aus *Ephedra distachya* gewonnen werden (2.2.1.5.). Hierbei wurden noch die Monosaccharide Rhamnose und Fucose in geringer Konzentration in der Acetylierungsanalyse detektiert. Eine Strukturaufklärung mittels Bindungstypanalyse konnte wegen der geringen Ausbeute nicht durchgeführt werden. Kraus (1991) vermutet, dass sich im wässrigen Extrakt aus den *Ginkgo biloba* Blättern ebenfalls ein Arabinan befindet, welches aus 1,5-Araf-Einheiten in der Hauptkette besteht. Aus *Abies sibirica* konnte ein Arabinan isoliert werden, welches sich aus 1,5-Araf-, 1,2,5-Araf-, 1,3,5-Araf- und 1,2,3,5-Araf-Einheiten zusammensetzt (Makarova *et al.*, 2015).

#### **4.1.3. Isolierung weiterer Polysaccharidfraktionen aus *Ginkgo biloba***

Der bei der Isolierung nach der Wasserextraktion anfallende Presskuchen von *Ginkgo biloba* wurde für weitere Extraktionen (in Anlehnung nach O'Rourke *et al.*, 2015 und Raimundo *et al.*, 2016) verwendet, um weitere Polysaccharidfraktionen wie Pektin-Polysaccharide und Hemicellulosen, z.B. Mannane und Xylane identifizieren zu können (2.2.1.2.). In der HMF von *Ginkgo biloba* liegen Arabinose und Galactose im Verhältnis 1:0,9 vor, welches für ein Vorkommen von einem AGP typisch ist.

Die hohen Mengen an Arabinose und Rhamnose, die niedrigere Menge an Galactose und der hohe photometrisch bestimmte Gesamturonsäuregehalt von 36,7% (m/m) weisen in der Ammoniumoxalatfraktion aus dem *Ginkgo biloba* Presskuchen auf ein Vorkommen von Pektin-Polysacchariden hin. Der hohe Arabinosegehalt könnte darin begründet liegen, dass lange Ketten von Arabinanen an das Pektin gebunden sind. Die hohe Menge der Glucose ist nicht eindeutig erklärbar. Möglicherweise wurden weitere Glucane mitgefällt. Ein Vorkommen von AGPs ist aufgrund der deutlichen geringeren Menge von Galactose eher unwahrscheinlich. O'Rourke *et al.* (2015) isolierten aus den Armleuchteralgen *Klebsormidium*, *Nitella* und *Chara* mittels Ammoniumoxalat-Extraktion Pektine vom Typ RG I und HR. Markarova und Shakhmatov (2020) isolierten aus den Laubblätter von *Picea abies* mit dem gleichen Extraktionsschritt Xylane, Glucomanne, AGPs und Pektine. Die Hauptbestandteile der Pektinpolysaccharide bilden 1,4- $\alpha$ -D-Galacturonan und partiell acetyliertes RG-I, dessen Seitenketten 1,5- $\alpha$ -L-Arabinane und Arabinogalactane vom Typ I tragen. Diese Strukturaufklärung würde die theoretische Annahme unterstützen, dass an das *Ginkgo*-Pektin ebenfalls Arabinane gebunden sein könnten.

Die nachfolgend durchgeführten HCl und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Extraktionen zeigt, dass vor allem in der HCl-Fraktion weiterhin Pektin-Polysaccharide isoliert wurden, wenn auch in geringeren Mengen als in der Ammoniumoxalatfraktion. Die Monosaccharidzusammensetzung beider Fraktionen ist sehr ähnlich. Der photometrisch gemessene Gesamturonsäuregehalt nimmt allerdings deutlich ab (Ammoniumoxalat: 36,7%; HCl: 12,9%; Natriumcarbonat: 3,9%). Markarova und Shakhmatov (2020) konnten mittels HCl-Extraktion aus den Laubblättern von *Picea abies* ein Vorkommen von weiteren Pektinen (s.o.) und AGPs belegen, welche zusätzlich in der Wasserextraktion vorzufinden waren.

Der geringfügig angestiegene Xylose-Gehalt in der KOH-Fraktion sowie die geringen vorkommenden Mengen von Arabinose, Galactose und Rhamnose weisen auf ein Vorkommen von Hemicellulose-Polysacchariden hin. Der Glucosegehalt ist auch bei dieser Fraktion mit Abstand am höchsten, welches auch hier auf ein Vorhandensein von verschiedenen Glucanen hinweist. Zusammenfassend bestätigt dieses Extraktionsverfahren ein mögliches Vorkommen von AGPs, Pektinpolysacchariden, Mannanen und Glucanen in den Blättern von *Ginkgo biloba*.

Zusammengefasst ergibt sich ein ungewöhnlicher Zellwandaufbau. Insbesondere zeigt sich die Glucose in allen Fraktionen als sehr dominant mit einem unauffälligen Pektingehalt.

Sehr auffällig ist ein fast vollständiges Fehlen der Xylose. Die Untersuchungen von Popper und Fry (2003) lassen vermuten, dass Xyloglucane in der primären Zellwand aller Landpflanzen vorzufinden sind, jedoch nicht in der Zellwand von Charophyceae. Damit kann vermutet werden, dass Xyloglucane für die evolutionäre Entwicklung von Wasser- zu Landpflanzen eine wichtige Rolle gespielt haben (Nothnagel und Nothnagel, 2007) und es ist daher erstaunlich, dass sie in den hier untersuchten Gymnospermen kaum vorkommen. In Abbildung 45 ist die vergleichende Darstellung der Monosaccharidzusammensetzung aller Extraktions-Fractionen mit dem zusätzlichen Gehalt der Gesamturonsäuren dargestellt.

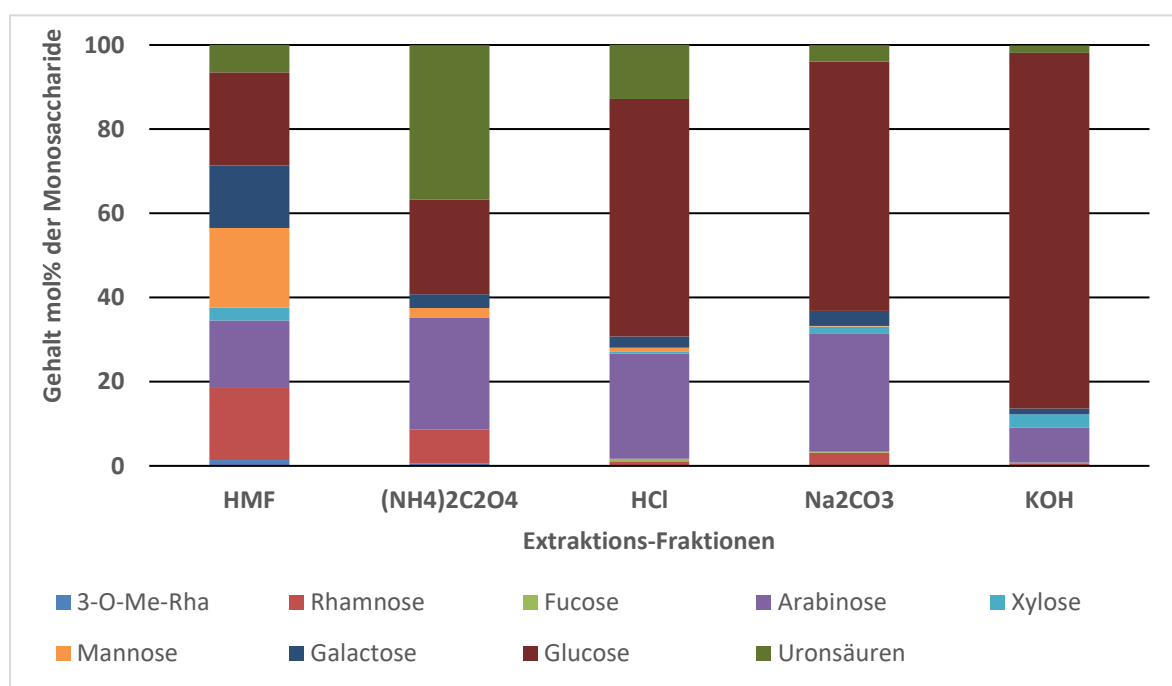


Abbildung 45: Konzentrationen (mol/mol%) der Monosaccharide der fünf Extraktions-Fractionen inkl. dem Gesamturonsäuregehalt

#### 4.1.4. Isolierung und Charakterisierung der AGPs

Zur Isolierung der AGPs wurden die gefriergetrockneten HMFs wieder in Lösung gebracht. Wasserunlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation abgetrennt. Für die anschließende Fällung wurde der klare Überstand verwendet. Für eine spezifische Fällung der AGPs wurde das Yariv Reagenz ( $\beta$ -D-Glc)<sub>3</sub> genutzt. Die Theorien über die benötigten strukturellen

Anforderungen dieses Reagenzes sind bereits in 1.4.4. dargelegt worden. Über die strukturellen Anforderungen des Kohlenhydratanteils für eine Interaktion gibt es unterschiedliche Aussagen. Kitazawa *et al.* (2013) geben an, dass die Entfernung von  $\alpha$ -L-Arabinoseeinheiten sowie 1,6-galactosehaltigen Seitenketten die Interaktion eines AGPs mit dem Yariv-Reagenz aus den Wurzeln von *Raphanus sativus* nicht beeinflusst. Die Fähigkeit der Bindung ging allerdings nach der Degradation des 1,3-galactosehaltigen *Backbones* verloren. Damit wird vermutet, dass die 1,3-Galactoseeinheiten eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem Yariv-Reagenz einzugehen scheinen. Für die Bindung werden vermutlich fünf bis sieben Galactoseeinheiten benötigt (Paulsen *et al.*, 2014).

Gleeson und Jermyn (1979) geben an, dass eine über 80%ige Entfernung des Proteinanteils, bei welcher jedoch die hydroxyprolinreiche Domäne erhalten bleibt, keinen Einfluss auf die Fällungsreaktion hat. Reine AGs ohne Proteinanteil, wie zum Beispiel aus Lärchen, zeigen keine Reaktion mit dem Yariv-Reagenz (Sato *et al.*, 2018). Allerdings zeigte sich, dass nach Abspaltung der 1,6-Galp Seitenketten aus Lärchen-AG das restliche 1,6-verknüpfte Galactan eine Interaktion mit Yariv-Reagenz aufwies (Sato *et al.*, 2018).

Über das Vorkommen und über den strukturellen Aufbau von AGPs in Gymnospermen ist bislang wenig bekannt. Es konnten zwei AGPs aus den Kallus-Zellen von *Picea abies* isoliert und charakterisiert werden (Karácsonyi *et al.*, 1998). Diese AGPs besitzen terminale furanosidische Arabinoseeinheiten sowie terminale, 1,3-, 1,6- und 1,3,6-verknüpfte  $\beta$ -D-Galactoseeinheiten. Zudem konnte Glucuronsäure und eine geringere Menge an Galacturonsäure nachgewiesen werden. Auffällig ist eine Verknüpfung mit Pyruvat an einige Galactoseeinheiten in beiden AGPs (Karácsonyi *et al.*, 1998). Das Vorkommen dieser Strukturmerkmale mit Ausnahme des Pyruvates sind von Makarova *et al.* (2015) bestätigt worden.

Weiterhin konnten AGPs in den Samen und Setzlingen von *Pinus taeda* und *Pseudotsuga menziestii* (Bobalek und Johnson, 1983) gefunden werden. AGPs wurden ebenso in *Pinus radiata* in der Mittellamelle der Tracheiden entdeckt. Diese bestehen im Wesentlichen aus furanosidischen Arabinoseeinheiten wie terminale und 1,5-Arabinose sowie pyranosidischen terminalen, 1,3-, 1,6- und 1,3,6-Galactoseeinheiten. Das Molekulargewicht liegt bei typischen 150 kDa. Die essentielle Funktion der AGPs in der Zelldifferenzierung konnte be-

stätigt werden, als auf einem mit Yariv-Reagenz versetzten Kultursystem der Zelltod beobachtet worden ist (Putoczki *et al.*, 2007). Makarova *et al.* (2015) fanden in diesem AGP eine auffällig hohe Menge an 1,5-Araf.

Ebenso vermuten Loopstra *et al.* (1999), dass das gefundene AGP in dem Xylem von *Pinus taeda* mitverantwortlich für die Entwicklung des Xylems ist und dass das extrazelluläre AGP bei der Entwicklung somatischer Embryonen aus *Picea abies* (Egertsdotter und von Arnold, 1995) und aus einem Hybrid von *Abies alba* x *Abies cephalonica* (Samaj *et al.*, 2007) eine regulatorische Funktion besitzt.

In *Cycas revoluta* und *Ginkgo biloba* konnten AGP-Epitope nahe der Plasmamembran in den Pollenkörnern detektiert werden (Nguema-Ona *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse legen nahe, dass AGPs auch bei Gymnospermen in unterschiedlichen Pflanzenorganen vertreten sind. Eine Isolierung und anschließende Charakterisierung der AGPs aus den Blättern von *Ginkgo biloba* sowie aus den oberirdischen Teilen von *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* wurde mit dieser Arbeit erstmalig durchgeführt. Weiterhin wurde das AGP von *Encephalartos longifolius* isoliert sowie die Neutralzuckeranalytik bestimmt.

Das abzentrifugierte Präzipitat, bestehend aus dem AGP-Yariv-Komplex sowie der Yariv-Überstand wurden jeweils mit Natriumdithionit versetzt, um das gebundene Yariv-Reagenz zu zerstören. Eine anschließende Dialyse sorgte für eine Abtrennung der Yariv-Bruchstücke. Die AGPs sowie die Überstände wurden anschließend gefriergetrocknet und konnten danach ausgewogen werden.

Der AGP-Gehalt der vier Gymnospermen liegt mit 0,02-0,05% unter dem Gehalt der Farne *Equisetum arvense*, *Dryopteris filix-mas*, *Osmunda regalis* und *Pteridium aquilinum* (0,08-0,18%) (Bartels und Classen, 2017) sowie unter jenem Gehalt des Mooses *Sphagnum sp.* (0,16%) (Bartels *et al.*, 2017). Er ist eher vergleichbar mit dem AGP-Gehalt aus der Wurzel von *Echinacea pallida* (0,01-0,08%) (Thude und Classen, 2005).

Die Ausbeuten der Gymnospermen-AGPs variierten zwischen 33,1% und 68,9%. Da der Proteinanteil ca. 10% ausmacht, Uronsäuren vorhanden sind und weitere Bestandteile wie Gerbstoffe verschleppt werden konnten, ergab die Ausbeute keine 100%. Der Arabinosegehalt der AGPs lag nach Acetylierungsanalyse zwischen 32,0-46,6% und der Galactosegehalt zwischen 23,8-47,9%. Das Ara/Gal Verhältnis aller AGPs liegt gemittelt ungefähr bei



1:1,0. Dieses ist damit ähnlich wie das Ara/Gal Verhältnis der Farne *Equisetum arvense* (1:1,0) und *Osmunda regalis* (1:1,4) (Classen *et al.*, 2019).

Während die AGPs von *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* grundlegende strukturelle Gemeinsamkeiten zeigen, die denen der Angiospermen-AGPs ähneln, zeigt das AGP von *Ginkgo biloba* einzigartige Strukturmerkmale. Daher wird die Charakterisierung der AGPs im Nachfolgenden getrennt dargestellt.

### **Charakterisierung der AGPs von *Ephedra distachya*, *Cycas revoluta* und *Encephalartos longifolius***

Die gefällten AGPs von *Ephedra distachya*, *Cycas revoluta* und *Encephalartos longifolius* bestehen wesentlich aus Arabinose und Galactose im Verhältnis 1:1,2; 1:0,9 und 1:0,7. Weiter vorkommende Monosaccharide in geringerer Konzentration sind Rhamnose bzw. 3-O-Methyl-Rhamnose, Mannose, Glucose sowie teilweise Xylose. Sehr auffällig ist der hohe Gehalt der 3-O-Methyl-Rhamnose, welcher in *Ephedra distachya* nachgewiesen worden ist. Weiterhin konnte dieser ungewöhnliche Zucker neben dem AGP von *Ginkgo biloba* auch in dem AGP von *Encephalartos longifolius*, jedoch nicht in dem AGP von *Cycas revoluta* nachgewiesen werden. Da sich die Gattung *Encephalartos* erst später als *Cycas* entwickelte (Sallas-Leiva *et al.*, 2013), besteht die Möglichkeit, dass sich dieser Zucker erst später in der Evolutionsgeschichte dieser Gattung in den AGPs entwickelt hat. So konnten im *Cycas revoluta* Yariv-Überstand Spuren dieses Zuckers gefunden werden, welcher eventuell aus Bindungen an Pektinen stammen könnten. Bei *Encephalartos* enthält die HMF größere Mengen an 3-O-Methyl-Rhamnose, welches ebenfalls teilweise Bestandteil von Pektinen sein könnte. Die Hauptmengen an Acofriose finden sich jedoch in den AGPs. Dies konnte bisher nur für verschiedene Moose und Farne gezeigt werden (Fu *et al.*, 2007; Bartels *et al.*, 2017; Happ und Classen, 2019). In Polysacchariden und AGPs der Angiospermen konnte dieser methylierte Zucker bisher gar nicht nachgewiesen werden und auch für Gymnospermen gibt es nur zwei alte Mitteilungen über das Vorkommen geringer Mengen von 3-O-Me-Rha im Holz von *Pinus nigra* (Gorrod und Jones, 1954) sowie im Harz der Gattungen *Araucaria*, *Encephalartos* und *Welwitschia* (Anderson, 1969). Damit wird in dieser Arbeit das erste Mal gezeigt, dass Acofriose Bestandteil von verschiedenen Gymnospermen-AGPs ist und z.T. sogar in größeren Mengen vorkommen. Größere Mengen der 3-O-Me-Rha konnten bislang

in den AGPs der Moose *Sphagnum* sp. (14,0%) *Physcomitrella patens* (13,5%) und in den AGPs der Farne *Equisetum arvense* (6,5%), *Osmunda japonica* (10,0%) und *Osmunda regalis* (8,1%) nachgewiesen werden (Classen *et al.*, 2019).

Der Gesamturonsäuregehalt wurde photometrisch nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) bestimmt und es wurde eine Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad (1972) durchgeführt. Anhand der ermittelten Ergebnisse können folgende Schlussfolgerungen zugelassen werden:

- 1.) Die AGPs bestehen wesentlich aus Arabinose und Galactose. Weitere gebundene Monosaccharide können Rhamnose bzw. 3-*O*-Methyl-Rhamnose, Glucose sowie Mannose sein. 3-*O*-Methyl-Rhamnose konnte in höheren Mengen nur im AGP von *Ephedra distachya* nachgewiesen werden, im AGP von *Cycas revoluta* fehlt dieses Monosaccharid (3.1.3.3.).
- 2.) Der photometrisch ermittelte Gesamturonsäuregehalt des AGPs von *Ephedra distachya* liegt bei 8,2% (m/m), jener des *Cycas revoluta*-AGPs liegt mit 6,6% (m/m) in einem ähnlichen Bereich (je 3.1.3.6.). Die Uronsäurereduktion ergab in den AGPs Hinweise auf das Vorkommen von Glucuron- und Galacturonsäure (Anstieg der Mengen an Glc und Gal in der Neutralzuckeranalytik nach der durchgeführten Uronsäurereduktion). Allerdings konnte nur das Vorkommen von Glucuronsäure anhand deuterierter Fragmente in den Massenspektren in der Acetylierungsanalyse in beiden uronsäurereduzierten AGPs nachgewiesen werden. Der Bindungstyp der Glucuronsäure konnte nicht ermittelt werden.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Bindungstypanalyse diskutiert.

#### **Bindungstypanalyse der AGPs von *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* mit Strukturvorschlag**

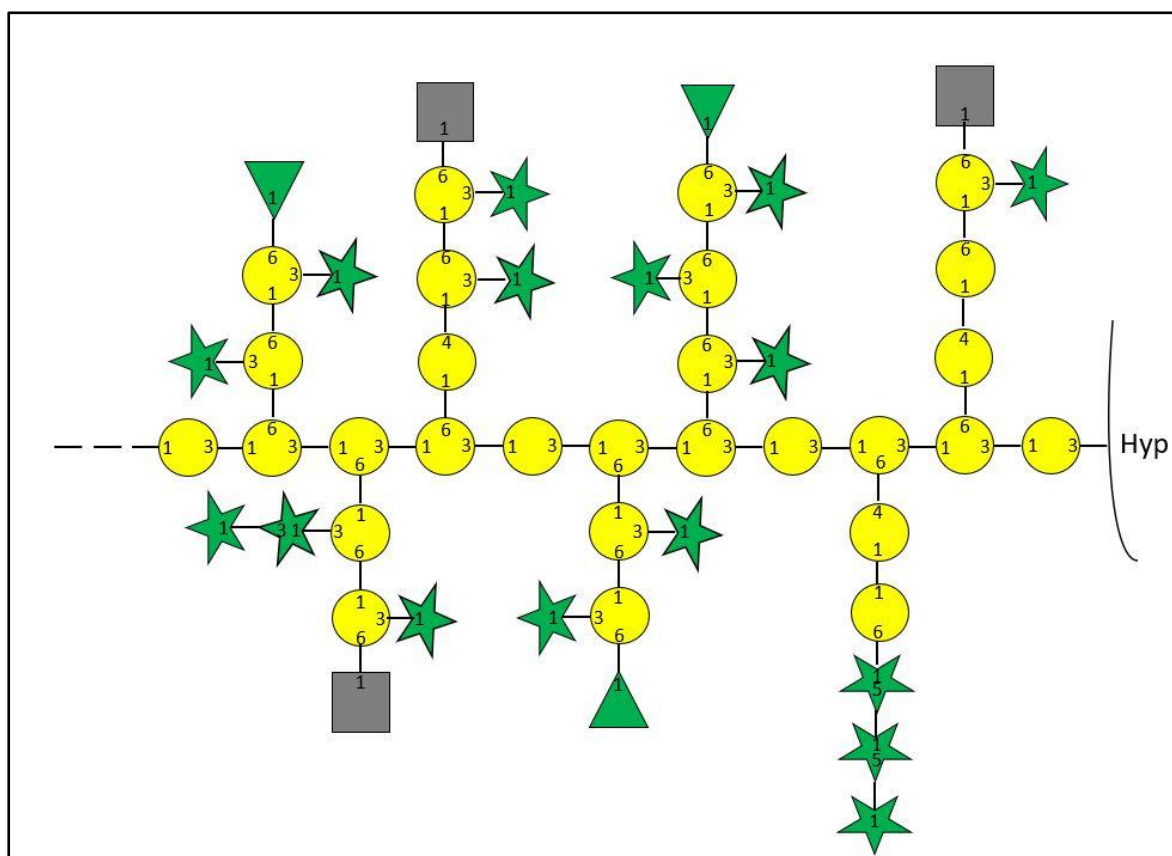
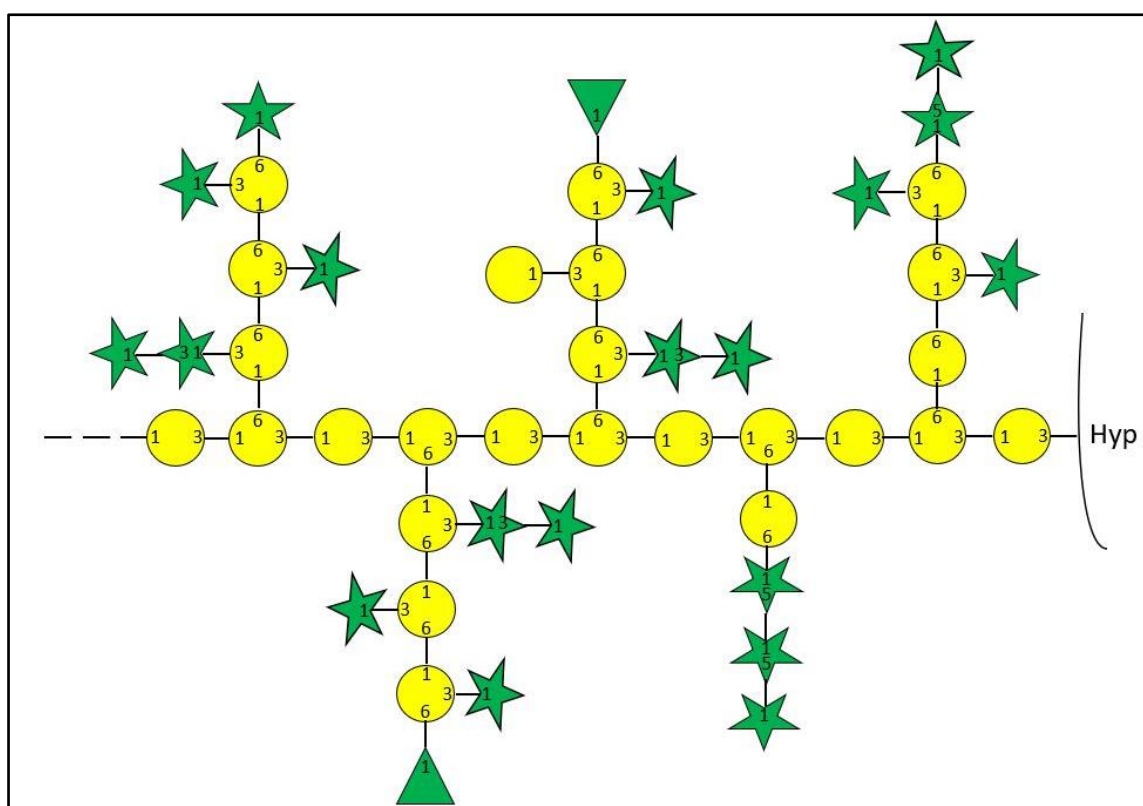
Bei beiden AGPs konnten alle Monosaccharidverknüpfungen, wie 1,3,6-Galp, 1,6-Galp, 1,3-Galp und 1-Araf erfasst werden, wie sie in den AGPs von Samenpflanzen bekannt und Teile von AGs Typ II sind (Clarke *et al.*, 1979). Diese beiden AGPs zeigen einen hohen Gehalt der 1,3,6-Galp, welches für AGPs mit einem hohen Verzweigungsgrad spricht. Diese Mengen

liegen damit in der gleichen Größenordnung wie in den AGPs von einigen Moosen und Farnen, deren Gehalt zwischen 21-36% liegt (Classen *et al.*, 2019).

Weiterhin kommt 1,3-Galp in höheren Mengen vor. Es ist auffällig, dass die Mengen dennoch kleiner sind als in bestimmten AGPs von den Moosen *Sphagnum sp.* (17,8%), und den Farnen *Equisetum arvense*, *Dryopteris filix-mas* und *Pteridium aquilinum* (16,3-20,6%) (Classen *et al.*, 2019). Der Gehalt der 1,6-Galp liegt niedrig unter 5% (mol%). Der Gehalt der 1,4-Galp ist deutlich niedriger als beim *Ginkgo biloba* AGP (*Ephedra distachya* AGP 2: 5,0% (mol%) und *Cycas revoluta* AGP: 1,1% (mol%)). Weiterhin kommt 1,5-Araf in geringeren Mengen im *Cycas revoluta* AGP als im *Ephedra distachya* AGP vor. Zusammenfassend handelt es sich bei beiden AGPs um ein AG-Typ II. Anhand der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse und unter Berücksichtigung des Endgruppen/Verzweigungsverhältnisses von 1:1,0 sowie der molaren Verhältnisse konnten folgende Strukturmodelle von dem Kohlenhydratanteil der beiden AGPs erstellt werden (siehe Abbildung 46-47). Quantitativ unbedeutendere Monosaccharide wie Mannose, Fucose und Xylose sind nicht mitberücksichtigt worden. Die Anzahl der quantitativ bedeutenden Monosaccharide für die Molekülstruktur wurden aus den ermittelten Molmassen berechnet (siehe Tabelle 31). Die in Klammern gesetzten Zucker wurden für das Strukturmodell nicht mitberücksichtigt.

Tabelle 31: Berechnungsgrundlage der Monosaccharide für den Kohlenhydratanteil der AGPs von *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta*

	<b><i>Ephedra distachya</i> Monosaccharide</b>	<b><i>Cycas revoluta</i> Monosaccharide</b>
1-Araf	13	11
1-Arap	-	2
1,3-Araf	1	3
1,5-Araf	2	3
1-Rhap/3-O-Me-Rhap	5	2
1-Glcp	-	(1)
1-Galp	-	1
1,3-Galp	4	6
1,4-Galp	3	-
1,6-Galp	2	2
1,3,6-Galp	19	16
Verhältnis		
End:Verzweigung	18:19	(17)16:16
Gesamtmenge	49	46

Abbildung 46: Strukturmodell für den Kohlenhydratanteil des nativen AGPs von *Ephedra distachya*Abbildung 47: Strukturmodell für den Kohlenhydratanteil des nativen AGPs von *Cycas revoluta*

Diese Strukturmodelle zeigen stark verzweigte Polysaccharide, bei welchen die Grundkette aus 1,3,6-Galp und 1,3-Galp besteht. Von dieser Hauptkette gehen weitere Verzweigungspunkte von 1,3,6-Galp in die Seitenketten aus, die ihrerseits wiederum verzweigt sind und vor allem terminale Arabinosen und auch Rhamnosens tragen.

### **Charakterisierung des AGPs von *Ginkgo biloba***

Das erste gefällte AGP aus der *Ginkgo biloba* Charge besteht aus Arabinose und Galactose im Verhältnis 1:0,8. Weiter vorkommende Monosaccharide sind Glucose, Rhamnose, 3-O Methyl-Rhamnose sowie Mannose. In der Hauptcharge ist ein auffallend hoher Gehalt an Glucose zu beobachten. Sehr wahrscheinlich sind noch glucosehaltige Bruchstücke des Yariv-Reagenzes an das AGP gebunden, welches bei der Behandlung mit Dithionit nicht vollständig zerstört worden ist. Das nachgefällte AGP aus der gleichen Charge weist einen deutlich geringeren Glucosegehalt auf. Der Gesamturonsäuregehalt wurde photometrisch nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) bestimmt. Die vorhandenen Uronsäuren werden durch die Methode von Blakeney *et al.* (1983) zur Neutralzuckerbestimmung nicht erfasst, können jedoch durch eine Reduktion nach Taylor und Conrad (1972) zu ihren korrespondierenden Neutralzuckern der Acetylierungsanalyse zugänglich gemacht werden. Damit ist es möglich, Rückschlüsse auf die Art der Uronsäuren und deren Verknüpfungen zu erhalten. Diese Zucker müssten im Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzung nach der Reduktion erhöht sein.

Damit ein Strukturmodell entwickelt werden konnte, wurden weitere Partialhydrolysen wie eine Oxalsäurehydrolyse nach Gleeson und Clarke (1979) eine alkalische Hydrolyse nach Volk *et al.* (2007) mit anschließend milder TFA-Hydrolyse sowie ein Perjodatabbau nach Usov *et al.* (1997) mit anschließender Neutralzuckeranalytik durchgeführt. Anhand der ermittelten Ergebnisse können folgende Schlussfolgerungen zugelassen werden:

- 1.) Das *Ginkgo biloba* AGP besteht wesentlich aus Arabinose und Galactose, weiter gebundene Monosaccharide können Rhamnose bzw. 3-O-Methyl-Rhamnose, Glucose sowie Mannose sein (3.1.3.3.).
- 3.) Der photometrisch bestimmte Gesamturonsäuregehalt liegt bei 7,9% (m/m). Die Uronsäurereduktion ergab in den AGPs Hinweise auf das Vorkommen von

Glucuron- und Galacturonsäure. Es konnte nur das Vorkommen von Glucuronsäure anhand der Massenspektren in der Acetylierungsanalyse in dem uronsäurereduzierten AGP nachgewiesen werden. Der Bindungstyp der Glucuronsäure konnte nicht ermittelt werden.

- 2.) Bei der Oxalsäurehydrolyse werden bevorzugt glykosidische Bindungen von Furanosen gespalten, also endständige Arabinosen und untereinander verknüpfte Arabinosen. Die Ergebnisse (3.1.3.8.) zeigen eine deutliche Reduktion des Arabinosewertes. Bei der 0,2 molaren TFA-Hydrolyse werden ebenso die furanosidisch verknüpften labilen Arabinosen abgespalten. Die vorherig durchgeführte alkalische Hydrolyse sorgte für eine Abspaltung des Proteinanteils, bei welchem nur noch die für die Bindung verantwortliche Aminosäure erhalten bleibt. Auffällig ist eine Reduktion des Glucosewertes im Vergleich zum nativen AGP. Da das AGP bei der alkalischen Hydrolyse für 18 Stunden bei 105°C hydrolysiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass bei dieser Hydrolyse durch die intensive Wärmeeinwirkung die noch gebundenen glucosehaltigen Yariv-Bruchstücke zerstört worden sind (Paulsen *et al.*, 2014). Die Ergebnisse beider Hydrolysen lassen vermuten, dass sich die Arabinosen in den Seitenketten befinden und dass das *Backbone* aus Galactoseeinheiten besteht.

### **Bindungstypanalyse des AGPs mit Strukturvorschlag von *Ginkgo biloba***

Aus der Bindungstypanalyse des nativen AGPs, des uronsäurereduzierten AGPs und des Oxalsäure hydrolysierten AGPs sollen Erkenntnisse über die Anordnung der Monosaccharide im Kohlenhydratteil erfasst werden.

Es konnten alle Monosaccharidverknüpfungen erfasst werden, wie sie in den AGPs von Samenpflanzen bekannt sind und Teile von AGs Typ II darstellen. Dieses sind 1,3,6-Galp, 1,6-Galp, 1,3-Galp und t-Araf (Clarke *et al.*, 1979). Weiterhin können 1,2-, 1,3- und 1,5-Araf Bestandteile der AGPs aus Angiospermen sein (Nothnagel *et al.*, 1997), welche ebenso nachgewiesen worden sind. Sehr auffällig ist der sehr hohe Gehalt der 1,4-Galp, welcher fast 45% des gesamten Kohlenhydratanteils ausmacht.

1,4-Galp ist ein klassischer Bestandteil der Hauptkette eines AGs Typ I (Clarke *et al.*, 1979; Hinz *et al.*, 2005) und konnte bereits in den AGPs einiger Moose und Farne nachgewiesen

werden, jedoch lag hier der Gehalt immer unter 10% (Bartels *et al.*, 2017; Bartels und Classen, 2017; Happ und Classen, 2019). Damit stellt das hohe Aufkommen ein außergewöhnliches Strukturmerkmal dar und zeigt, dass im AGP von *Ginkgo* eine Mischung aus AGs vom Typ I und Typ II vorkommen.

Weiterhin kommt 1,5-Araf in ungewöhnlich hohen Mengen vor, die ähnlich vergleichbar sind mit denen von *Equisetum arvense* (Bartels und Classen, 2017). Dieses spricht für eine flexiblere und längere Anordnung der Arabinosen in den Seitenketten als in Angiospermen, die normalerweise hauptsächlich terminale Arabinosen aufweisen (Lee *et al.*, 2005).

Beim uronsäurereduzierten AGP wurden die Uronsäuren zu ihren korrespondierenden Neutralzuckern reduziert. Beim Vorhandensein von Glucuron- bzw. Galacturonsäure wäre damit ein Anstieg der Monosaccharide Glucose und Galactose zu verzeichnen gewesen. Da es in der Bindungstypanalyse des uronsäurereduzierten AGPs zu einer Verringerung beider Werte gekommen ist, kann keine endgültige Aussage über die Art und die vorkommende Menge der Uronsäuren getroffen werden.

Das Oxalsäure hydrolysierte AGP zeigt einen deutlich gesunkenen Gesamtarabinosegehalt und gleichzeitig einen deutlichen Anstieg von 1,6-Galp-Einheiten. Damit liegt die Vermutung nahe, dass sich Arabinosen an Position 3 der 1,3,6-Galp befinden.

Für eine umfassendere Aussage hätten Mehrfachanalysen durchgeführt werden müssen. Ebenso ist eine erfolgreiche Analyse des Smith-degradierten AGPs erforderlich, um weitere Einblicke in das Verknüpfungsmuster zu erhalten. Für weitere Aufklärungen hätte eine Hydrolyse durch Enzyme wie Endo- bzw. Exo-Galactanase bzw. Arabinofuranosidase durchgeführt werden können, um bestimmte glycosidische Bindungen zu spalten. Zudem können mittels Kernspinresonanzspektroskopie/NMR Aussagen zur  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Konformation, über Bindungstypen sowie über das Vorkommen von Substituenten getroffen werden (Göllner, 2009).

Anhand der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse und unter Berücksichtigung des Endgruppen/Verzweigungsverhältnisses von 1:0,8 sowie der molaren Verhältnisse konnte folgende Strukturmodelle des Kohlenhydrateils des *Ginkgo biloba* AGPs erstellt werden (siehe Abbildung 48-49). Quantitativ unbedeutendere Monosaccharide wie Mannose, Fucose und Xylose sind nicht mitberücksichtigt worden. Die Anzahl der quantitativ bedeuten-

den Monosaccharide für die Molekülstruktur wurden aus den ermittelten Molmassen berechnet (siehe Tabelle 32). Die in Klammern gesetzten Zucker wurden für die Strukturmodelle nicht mitberücksichtigt.

Tabelle 32: Berechnungsgrundlage der Monosaccharide für den Kohlenhydratanteil des AGPs von  
*Ginkgo biloba*

	<b><i>Ginkgo biloba</i> Monosaccharide Strukturvorschlag</b>	<b><i>Ginkgo biloba</i> Monosaccharide Strukturvorschlag</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>
1-Araf	4	8
1,3-Araf	1	2
1,5-Araf	6	12
1-Rhap/3-O-Me-Rhap	2	3
1-Glcp	(2)	(4)
1-Galp	1	2
1,3-Galp	1	2
1,4-Galp	22	-
1,6-Galp	-	1
1,3,6-Galp	6	12
Verhältnis		
End:Verzweigung	(9)7:6	(17)13:12
Gesamtmenge	43	42



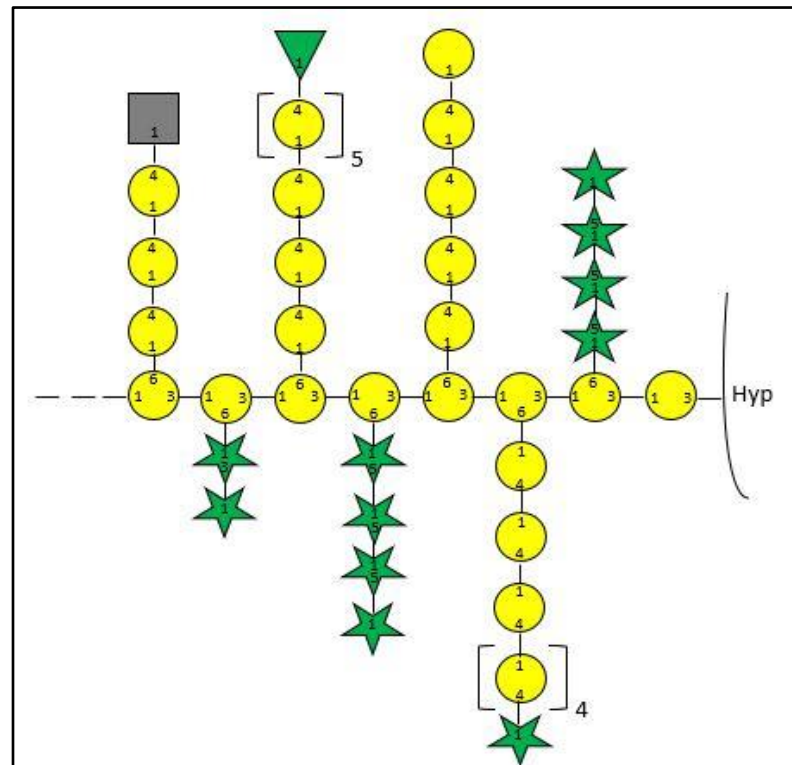


Abbildung 48: Strukturmodell für den Kohlenhydratanteil des nativen AGPs von *Ginkgo biloba*  
mit 1,4-Galp-Einheiten

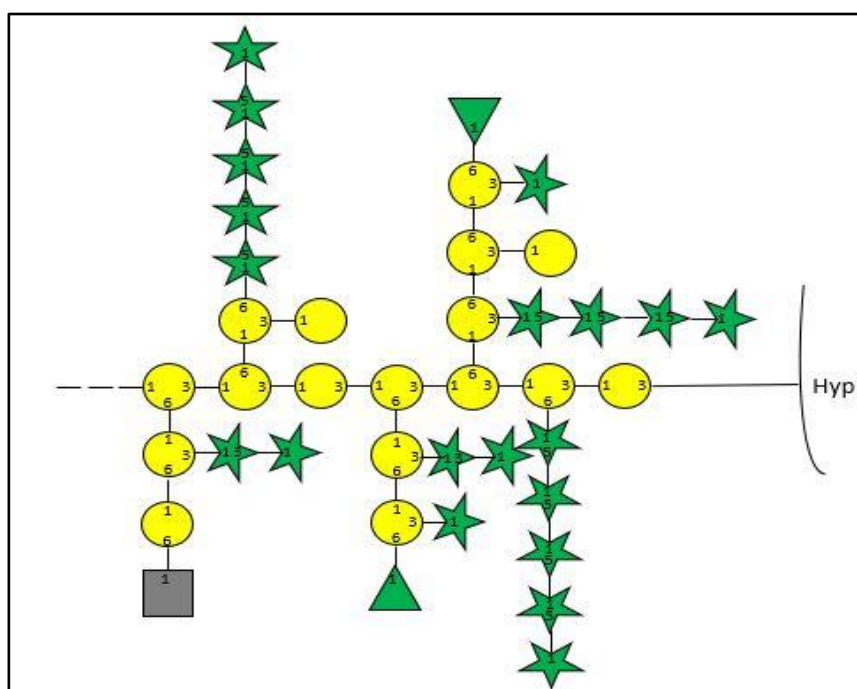
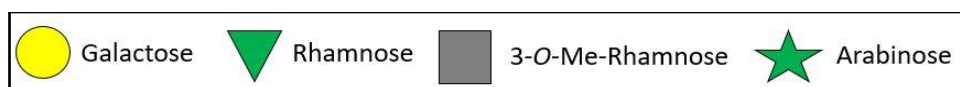


Abbildung 49: Strukturmodell für den Kohlenhydratanteil des nativen AGPs von *Ginkgo biloba*  
ohne 1,4-Galp-Einheiten



Das erste Strukturmodell (siehe Abbildung 48) zeigt einen stark verzweigten Kohlenhydranteil, bei welchem die Grundkette aus 1,3,6-Galp und sehr wenig 1,3-Galp besteht. Die Seitenketten bestehen aus überwiegend 1,4-Galp, 1,3-Araf und 1,5-Araf Einheiten. Die terminalen Endgruppen können 1-Araf, 1-Glcp bzw. GlcAp, 1-Galp bzw. GalAp, 1-Rhap und 3-O-Me-Rhap bilden.

Im zweiten Strukturvorschlag (siehe Abbildung 49) gleichen sich die vorhandenen Mengen der Arabinosen und Galactosen durch das Fehlen der 1,4-Galp-Einheiten nahezu an. Dadurch zeigen sich im Vergleich zum ersten Strukturvorschlag deutlich kürzere Seitenketten, die fast nur aus Arabinoseeinheiten bestehen, welche an 1,3,6-Galp gebunden sein können. Auch hier besteht das Grundgerüst aus 1,3,6-Galp und sehr wenig 1,3-Galp. Bei diesem Strukturvorschlag müßte dann ein lineares 1,4-Galactan vermutlich kovalent an das gezeigte Strukturmodell gebunden sein. Eine kovalente Verknüpfung von AGPs mit anderen Polysacchariden konnte z.B. in *Arabidopsis* gezeigt werden; dort wurde ein Arabinoxylan-Pektin-AGP identifiziert (Tan *et al.*, 2013).

Ein drittes Strukturmodell wäre denkbar, bei welchem sich das Grundgerüst aus sehr vielen 1,4-Galp-Einheiten im Wechsel mit 1,3-Galp und 1,3,6-Galp zusammensetzt.

#### 4.1.5. Bindung von AGPs an Antikörper

Eine weitere Möglichkeit der Strukturaufklärung bietet der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Hierbei wurden monoklonale Antikörper mit einer hohen Spezifität gegenüber bestimmten AGP-Epitopen als primäre Antikörper eingesetzt. Mit der darauffolgenden Bindung eines Sekundärantikörpers und einer anschließenden Farbreaktion kann die Bindung des primären Antikörpers erkennbar gemacht werden und zusätzlich quantifiziert werden (2.3.1.).

Bei den genutzten Antikörpern JIM 13, MAC 207 und KM 1 handelt es sich um typische AGP-Antikörper, die an Epitope der Angiospermen-AGPs binden. Weiterhin erkennen die eingesetzten Antikörper LM 2 und LM 6 typische Bausteine von Angiospermen AGPs. Aufgrund der strukturellen Besonderheit des *Ginkgo*-AGPs wurden 2 Antikörper (LM5, LM26) getestet, die 1,4-verknüpfte Galp-Epitope erkennen.

**JIM 13 (Epitop: AGP, evtl.  $\beta$ -D-GlcAp-(1→3)- $\alpha$ -D-GalAp-(1→2)- $\alpha$ -L-Rha)****MAC 207 (Epitop: AGP, evtl.  $\beta$ -D-GlcAp-(1→3)- $\alpha$ -D-GalAp-(1→2)- $\alpha$ -L-Rha):**

Beide Antikörper (JIM 13 und MAC 207) zeigen eine schwache Bindung an das oben genannte Trisaccharid, welches nach saurer Hydrolyse aus Karayagummi gewonnen wurde (Yates *et al.*, 1996). Beide Antikörper reagieren jedoch mit vielen typischen Angiospermen-AGPs, die ein solches Epitop nicht aufweisen. Insofern ist die Natur des hauptsächlichsten, auf AGPs vorhandenen Epitopes unklar. Für die Antikörper JIM 13 und MAC 207 sind Epitopstruktur beschrieben, jedoch konnte im Rahmen der Untersuchungen des Arbeitskreises ein nicht eindeutiges Bindungsverhalten an definierte Epitope des Antikörpers beobachtet werden. Für den Antikörper JIM 13 sind bei allen untersuchten Gymnospermen-AGPs positive Reaktionen beobachtet worden, wobei insbesondere das AGP von *Cycas* eine starke Bindung zeigt. Diese Bindung von konnte bereits mit den Zellwänden von gekeimten Pollen bestätigt werden (Yatomi *et al.*, 2002). Hierbei ist anzumerken, dass dieses AGP die geringsten photometrisch bestimmten Gesamturonsäuremengen aufweist und sich aus der Bindungstypanalyse der geringste Gesamtgehalt von Rhamnose ergab. Dass AGPs in die Taxolproduktion in *Taxus cuspidata* involviert sind, konnte durch eine Bindung von JIM 13 bestätigt werden (Cheng *et al.*, 2008). Weiterhin zeigte sich eine positive Reaktion von JIM 13 mit der Zellwand des Pollenschlauches von *Pinus densiflora* (Mogami *et al.*, 1998) und den Samenanlagen von *Larix decidua* (Rafinska und Bednarska, 2011).

Für den Antikörper MAC 207 konnte keine Bindung wie für JIM 13 beobachtet werden. Damit zeigt sich, dass beide Antikörper an unterschiedliche, noch aktuell nicht bekannte, Epitope binden könnten. Die Bindung von MAC 207 an ein AGP-Epitop ist bei den Gymnospermen *Pinus radiata*, *Pinus sitchensis* und *Pinus abies* beobachtet worden (Altaner *et al.*, 2010).

**KM 1 (Epitop: (1→6)- $\beta$ -D-Galp Einheiten in AGs Typ II)**

Der Antikörper KM 1 zeigt keine Interaktionen mit den eingesetzten nativen Gymnospermen-AGPs, welches in der sehr geringen Menge der 1,6-Galp begründet liegen könnte.

Nach der Oxalsäurehydrolyse des *Ginkgo*-AGPs ist ein Freilegen des Epitopes möglich, welches die deutlich höhere Affinität bestätigt. Nach Ruprecht *et al.* (2017) ist für eine deutliche Bindung dieses Antikörpers vor allem ein 1,6-verknüpftes Galactan notwendig. Nach

der Oxalsäurehydrolyse des *Ginkgo*-AGPs wurde dieses Epitop freigelegt, was durch die deutlich höhere Affinität bestätigt wurde.

### **LM 2 (Epitop: (1→6)-β-D-Galp Einheiten mit terminaler β-D-GlcAp im AGP)**

Rubrecht *et al.* (2017) konnten belegen, dass ein Oligosaccharid aus 3 Einheiten 1,6-Galp mit einer terminalen Glucuronsäure eine gute Bindung an den Antikörper LM 2 zeigt. Da die Konzentration der 1,6-Galp beim *Ginkgo*-AGP unter 5% lag, konnte nur eine mäßig starke Bindung bei diesem Antikörper beobachtet werden. Die Bindung bestätigt zusätzlich das Vorkommen von Glucuronsäuren. Diese Bindung wurde bereits durch eine Reaktion mit den gekeimten Pollen von *Ginkgo* und *Cycas* bestätigt (Yatomi *et al.*, 2002).

Dieser Antikörper zeigte ebenso positive Reaktionen mit den AGPs in einem Pollenschlauch von *Picea wilsonii* (Chen *et al.*, 2008), *Pinus densiflora* (Mogami *et al.*, 1998) und den Samenanlagen von *Larix decidua* (Rafinska und Bednarska, 2011).

### **LM 5 (Epitop: [(1→4)-β-D-Gal]<sub>3</sub>)**

Torode *et al.* (2018) und Jones *et al.* (1997) geben an, dass für die Bindung des Antikörpers LM 5 eine lineare 1,4-Galactosekette vorliegen muss. 1,4-Galactotriose zeigt die stärkste Bindung, die sich bei Galactopentaose abschwächt und bei Galactoheptaose nur noch 50 % beträgt. Die Verwendung von 1,4-Galactose-Oligosacchariden mit Verzweigungen führte zum vollständigen Verlust der Bindungsaffinität (Torode *et al.*, 2018). Das native *Ginkgo*-AGP zeigt eine mäßig starke Bindung des Antikörpers. Eine Abschwächung der Bindung kann in dem Vorkommen langer linearer 1,4-Galp Ketten begründet liegen. Sehr auffällig ist die sehr schwache Bindung zu dem AGP<sub>Oxal</sub> und die nicht vorhandene Bindung zu dem AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub>. Für das AGP<sub>Oxal</sub> ist eine gleichbleibend starke Bindung erwartet worden, da die Oxalsäurebehandlung zu keiner Abnahme der Galactosemengen führen sollte. Dieser Antikörper zeigte positive Reaktionen mit den in den Tracheiden vorkommenden Polysacchariden aus den Gymnospermen *Pinus radiata*, *Pinus sitchensis* und *Pinus abies* (Altaner *et al.*, 2010) und denen in einem Pollenschlauch von *Picea wilsonii* (Chen *et al.*, 2008).

### **LM 6 (Epitop: (1,5)-α-L-Araf im Arabinan/AGP)**

Nach Willats *et al.* (1998) erkennt der Antikörper LM 6 fünf bis sechs lineare 1,5-Araf-Einheiten. Allerdings konnte kaum eine nachweisbare Bindung im ELISA-Versuch an das native

*Ginkgo*-AGP erkennbar gemacht werden, trotz eines hohen 1,5-Araf-Gehaltes von ca. 12% (3.1.3.9.). Dieses spricht für das Vorkommen von kürzeren Arabinoseketten aus überwiegend maximal vier Einheiten.

#### **LM 26 (Epitop: 1,6-Galp-Verknüpfung in (1,4-Galp)- $\beta$ -D-Galactan)**

Torode *et al.* (2018) beschreiben, dass für eine optimale Bindung mehr als drei 1,4-Galactoseeinheiten vorhanden sein müssen, von denen eine mit einer 1,6-Galactoseeinheit verknüpft ist. Die starke Bindung dieses Antikörpers an das native und das Oxalsäure hydrolysierte *Ginkgo*-AGP ist erstaunlich, da eine solche Verzweigung im *Ginkgo*-AGP nicht nachgewiesen werden konnte. Insofern scheint es weitere Epitope mit 1,4-Galp zu geben, die eine Interaktion mit LM 26 eingehen. In der Bindungstypanalyse ist ein geringer Gehalt von 1,4-Galp im AGP von *Ephedra distachya* nachgewiesen worden, welches sich in einer mäßig starken Bindung des Antikörpers widerspiegelt. Die sehr geringe Menge der 1,4-Galp im *Cycas*-AGP zeigt sich in der sehr schwachen Antikörperbindung. Dieses Bindungsverhalten bestätigt die angegebene Literaturangabe, dass eine bestimmte Anzahl an 1,4-Galp-Einheiten für eine Bindung notwendig ist.

#### **4.1.6. Charakterisierung der Proteinanteile**

Die Elementaranalyse ergab aus der Multiplikation des Stickstoffgehaltes mit dem Faktor nach Kieldahl (1883) von 6,5 für die AGPs der Gymnospermen *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* einen Proteingehalt von 7,2%, 7,4% und 5,1%. Damit liegt der Proteingehalt in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Samenpflanzen (Ma *et al.*, 2018) sowie einigen Farnen wie *Equisetum arvense*, *Dryopteris filix-mas*, *Osmunda regalis* und *Pteridium aquilinum*, deren Gehalt zwischen 6-12% liegt (Bartels und Classen, 2017). Die getrockneten Samen der Gymnospermen *Pseudotsuga menziesii* und *Pinus taeda* weisen mit 8,8% bzw. 6,1% einen ähnlichen Gehalt auf (Bobalek und Johnson, 1982). Hohe Proteinmengen konnten in dem AGP des Mooses *Polytrichastrum formosum* (18%) (Bartels *et al.*, 2017) und *Lycopodium annotinum* (17%) (Bartels und Classen, 2017) nachgewiesen werden.

Die Aminosäure Hydroxyprolin kann im AGP von Samenpflanzen den Proteinanteil mit dem Kohlenhydratanteil durch eine O-glykosidische Bindung miteinander verbinden.

Die photometrische Messung des Hydroxyprolingehaltes ergab einen Gehalt beim *Ginkgo biloba* AGP von 0,49% (m/m), dieses entspricht 6,82% am Proteingesamtanteil. Dass Hydroxyprolin die entscheidende Aminosäure zur Verknüpfung ist, wird durch den Hydroxyprolingehalt von 0,32% (m/m) beim alkalisch hydrolysierten AGP bestätigt. Der Wert entspricht nicht dem des nativen AGPs, welches darin begründet liegen könnte, dass für die Verknüpfung weitere Aminosäuren wie Serin oder Threonin verantwortlich sein können.

Der Hydroxyprolingehalt umfasst bei dem *Ephedra distachya* AGP 0,71% (m/m) und bei dem *Cycas revoluta* AGP 1,14% (m/m). Damit macht Hydroxyprolin bei *Ephedra distachya* 9,54% und bei *Cycas revoluta* 22,53% des Proteinanteils aus. Der Hydroxyprolingehalt ist vergleichbar mit den ebenso photometrisch bestimmten Hydroxyprolinwerten von *Lycopodium annotinum* mit 0,88% (m/m) und *Equisetum arvense* mit 1,09% (m/m) (Bartels und Classen, 2019). Der Hydroxyprolingehalt beider untersuchten Gymnospermen ist damit ähnlich wie jener aus den getrockneten Samen von *Pseudotsuga menziesii* (0,9%) und *Pinus taeda* (0,7%) (Bobalek und Johnson, 1982). Karácsonyi *et al.* (1997) analysierten die Proteinzusammensetzung des AGPs aus *Picea abies* und fanden heraus, dass neben einem Hydroxyprolingehalt von ca. 13% die Aminosäuren Serin und Threonin nicht in die Kohlenhydrat-Proteinverknüpfung involviert sind.

Für eine detailliertere Aussage hätte die gesamte Aminosäurezusammensetzung zum Beispiel mittels HPLC-Analytik durchgeführt werden müssen.

#### 4.1.7. Bestimmung des Molekulargewichtes

Für die nativen AGPs wurde das durchschnittlich absolute Molekulargewicht mittels SEC-MALLS ermittelt (2.2.5.). Für das native *Ginkgo biloba* AGP konnte ein absolutes Molekulargewicht von ungewöhnlich großen 520,4 kDa (Hydrodynamisches Volumen: 58,0 kDa) ermittelt werden. Hieraus ist ersichtlich, dass es sich allgemein gesehen um ein sehr großes AGP-Molekül handeln muss, welches vermutlich durch den hohen Gehalt der 1,4-Galp in den Seitenketten bedingt ist. Ein ähnliches großes AGP ist aus *Anogeissus latifolia* mit einer

Größe von 554 kDa beschrieben worden (Ghosh *et al.*, 2015). Ein im Verhältnis zum Molekulargewicht geringes hydrodynamisches Volumen, welches durch die räumliche Struktur und die Hydrathülle beeinflusst wird, deutet auf ein stärker verzweigtes AGP hin.

Der Proteinanteil des AGPs ergibt nach Elementaranalyse 7,2% und würde damit eine Größe von 37,5 kDa besitzen. Da der Hydroxyprolinanteil 6,8% (m/m) des Proteins ausmacht, würden sich rechnerisch 19 Moleküle Hydroxyprolin im Protein befinden. Verteilt man diese Hydroxyprolinanzahl auf die Gesamtmolekülmasse würden sich Kohlenhydratanteile von je ca. 25 kDa ergeben. Das alkalische AGP besitzt ein Molekulargewicht von 163,5 kDa, welches in einer unvollständigen Hydrolyse begründet liegen könnte. Die Molekulargewichte der partialhydrolysierten AGPs nahmen je nach Methode deutlich ab. Der Unterschied zwischen dem absoluten Molekulargewicht und dem hydrodynamischen Volumen war nicht mehr so deutlich, welches auf eine Abnahme des Verzweigungsgrades hinweist. Ellis *et al.* (2010) geben eine Größe von 5 bis 25 kDa an, welches 30-120 Monosacchariden entspricht. Die AGs des Weizen-AGPs besitzen ein Molekulargewicht von 20 kDa (Göllner *et al.*, 2010). Die Zuckerketten des AGPs aus *Echinacea purpurea* weisen dagegen ein Molekulargewicht von 30 kDa auf (Volk *et al.*, 2007).

Das *Ephedra distachya* AGP 2 besitzt ein absolutes Molekulargewicht von 132,6 kDa (hydrodynamisches Volumen: 47,5 kDa). Der ermittelte Proteinanteil liegt bei 7,4% und würde damit eine Größe von 9,8 kDa einnehmen. Da Hydroxyprolin wie oben beschrieben 9,5% des Proteinanteils ausmacht, würden sich rechnerisch ca. 7 Moleküle Hydroxyprolin in dem Protein befinden. Verteilt man diese Hydroxyprolinanzahl auf die Gesamtmolekülmasse würden sich Kohlenhydratanteile von je ca. 17,5 kDa ergeben.

Das *Cycas revoluta* AGP besitzt ein Molekulargewicht von 180,9 kDa (hydrodynamisches Volumen: 77,6 kDa) mit einem Proteinanteil von 9,2 kDa (5,1%). Da Hydroxyprolin 22,5% des Proteinanteils ausmacht, befinden sich ca. 16 Moleküle Hydroxyprolin in dem Protein. Damit würden die Kohlenhydratanteile eine Größe von 10,7 kDa besitzen.

Die Gesamtmolekulargewichte der AGPs von *Ephedra* und *Cycas* fallen demnach nach Nothnagel (1997) in die typische AGP-Molekulargrößenordnung. Auch hier deutet, wie bereits erwähnt, das geringere hydrodynamische Volumen im Vergleich zum Molekulargewicht auf ein stark verzweigtes Molekül hin, welches insbesondere für das AGP von *Ephedra distachya* zutrifft.

Für detailliertere Aussagen hätten auch hier die Methode weiter optimiert werden oder eine andere Säule verwendet werden müssen, um Störfaktoren wie eine unvollständige Peaktrennungen zu verringern. Die ermittelten Molekulargewichte sind daher eher als Tendenz zu betrachten.

Für die Beschreibung der räumlichen Struktur der AGPs existieren drei verschiedene Modelle. Das „*wattle-blossom*“-Modell wurde zuerst durch Fincher *et al.* (1983) für ein AGP aus *Gummi arabicum* beschrieben, welches ein Protein-Rückgrat besitzt, das verzweigte AG-Seitenketten zeigt. Hier wird von einer globulären Struktur ausgegangen.

Qi *et al.* (1991) beschreiben ein *twisted hairy rope model*, welches ein langgestrecktes Molekül zeigt. Weiterhin wurde von Sanchez *et al.* (2007) ein weiteres Strukturmodell einer scheibenförmigen Struktur von dem AGP aus *Gummi arabicum* nachgewiesen (1.4.6.). Für die AGPs aus den analysierten Gymnospermen würde aufgrund des Vergleiches der absoluten Molekulargewichte zu den hydrodynamischen Volumina eher das „*wattle blossom*“ Modell zutreffen, welches bereits schon für Moose (Bartels *et al.*, 2017) und Samenpflanzen (Fincher *et al.*, 1983) beschrieben worden ist.

Diese Ergebnisse der Strukturaufklärung über die drei Gymnospermen-AGPs tragen zu einem besseren Verständnis der evolutionären Entwicklung der AGPs und damit zum Aufbau der pflanzlichen Zellwand bei. Um einen umfassenderen Einblick in die AGP-Entwicklung und einen größeren Vergleich zu den AGPs anderer Pflanzengruppen zu erhalten, wird die Charakterisierung der AGPs von weiteren ausgewählten Arten aller Abteilungen der Gymnospermen nötig sein. Weiterhin müssten die strukturabhängigen Funktionen der AGPs in der pflanzlichen Zellwand von Gymnospermen aufgeklärt werden.

## 4.2. Interaktionsstudien mit humanen Galektinen

Bei Galektinen handelt es sich um  $\beta$ -Galactosidbindenden Lektine, welche über zahlreiche intrazelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Zelltod und mRNA-Splicing sowie extrazelluläre Funktionen wie Zelladhäsion verfügen. Für die extrazellulären Funktionen ist die Interaktion mit verschiedenen Glykoproteinen und Glykolipiden an der Zelloberfläche von



immenser Bedeutung (Miller *et al.*, 2009). Für die Interaktion sind zwei Mechanismen verantwortlich: Eine hydrophile Wechselwirkung bestimmter OH-Gruppen des Zuckers über Wasserstoffbrückenbindungen mit hydrophilen Einheiten des Galektins sowie hydrophobe Wechselwirkungen der nichtpolaren Einheiten im Galactosering des Zuckers und der aromatischen Aminosäure Tryptophan im Galektin (Di Lella *et al.*, 2009; Dings *et al.*, 2018). Dabei kann jede CRD ein Tetrasaccharid aufnehmen (Cousin und Cloninger, 2016). Die Galektine reagieren in Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen CRDs bivalent oder multivalent (Liu und Rabinovich, 2005).

Bei Galektin-1 handelt es sich um ein Polypeptid mit einer Größe von 14 kDa (Bürger *et al.*, 1996), welches als Monomer oder Dimer vorkommt (van der Leij *et al.*, 2004) und an zahlreichen Funktionen wie Zelladhäsion, tumorinduzierten Angiogenese und Zelltod beteiligt ist (Cousin und Cloninger, 2016). Die CRD zeigt wie bei allen Galektinen eine  $\beta$ -Sandwichstruktur (Miller *et al.*, 2015) und ist an der Interaktion zahlreicher Glykoproteine mit  $\beta$ -Galactoseverknüpfung wie Laminin und Fibronectin beteiligt (Miller *et al.*, 2009).

Galektin-3 ist ein Galektin vom chimären Typ (Dings *et al.*, 2018). Eine einzelne Polypeptidkette bildet zwei verschiedene Domänen aus: Eine C-terminale zur Kohlenhydratbindung und eine N-terminale Domäne, welche für die Bildung von Oligomeren verantwortlich ist (Dumic *et al.*, 2006). Wie Galektin-1 spielt es eine wichtige Rolle bei verschiedenen Zellvorgängen wie Zelladhäsion, Zellwachstum, Chemotaxis, Apoptose und Angiogenese (Fortuna-Costa *et al.*, 2014) durch Bindung an zahlreiche intrazelluläre und extrazelluläre Glykoproteine (Ahmed und AlSadek, 2015).

Die Galektine-1 und -3 kommen bevorzugt in Immunzellen vor (Punt *et al.*, 2015).

Für die Untersuchung der Bindung zwischen Lektinen und ihren Liganden eignen sich verschiedene Methoden wie die isothermale Titrationskalorimetrie (Di Lella *et al.*, 2009) oder auch BLI. Weiterhin wurde zum Beispiel die Bindungsaffinität mittels BLI zwischen dem rekombinanten Fusionsprotein Aflibercept (Eylea®), welches zur Behandlung der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration eingesetzt wird, und Galektin-1 untersucht (Kanda *et al.*, 2015).

Lactose und N-Acetyl-D-Lactosamin (LacNac) zeigen die einfachsten strukturellen Grundanforderungen, um eine Interaktion mit Galektinen einzugehen (Kamili *et al.*, 2016). Die

meisten Galektine, so auch Galektine-1 und -3, binden dabei LacNac deutlich effektiver als Lactose (Salomonsson *et al.*, 2010). Bei der Verknüpfung von Galactose mit einem Bindungspartner, wie Glucose in dem Disaccharid Lactose, erhöht sich die Bindungsaffinität um das 50zifache auf ca.  $K_D = 0,2 \text{ mM}$ . Zusätzliche Zucker an Position 3 der Galactose ergeben eine noch stärkere Bindung mit  $K_D$ -Werten im mikromolaren Bereich (Saraboji *et al.*, 2012). Mittels BLI-Studien mit den Liganden Gal $\beta$ 1-4GlcNac und Gal $\beta$ 1-3GlcNac konnte bewiesen werden, dass die Galektin-1 und -3 bevorzugt Gal $\beta$ 1-4GlcNac binden. So lag der ermittelte  $K_D$ -Wert bei der Interaktionsmessung von Gal $\beta$ 1-4GlcNac mit Galektin-1 bei  $150 \text{ }\mu\text{M}$  und bei  $33 \text{ }\mu\text{M}$  mit Galektin-3. Die Interaktionsmessung von Gal $\beta$ 1-3GlcNac mit diesen Galektinen ergab eine schwächere Bindung ( $K_D$ :  $340 \text{ }\mu\text{M}$  mit Galektin-1 sowie  $93 \text{ }\mu\text{M}$  mit Galektin-3 (Hsieh *et al.*, 2015). Ein klassischer Ligand für Galektin-3 ist weiterhin Asialofetuin (ASF), ein multivalentes Glykoprotein, welches neun LacNac-Epitope aufweist (Bumba *et al.*, 2018). Weitere Untersuchungen zeigen, dass einige Galektine wie Galektin-1, -2, -3, -7, -8 und -9 bevorzugt an PolyLacNac-Einheiten binden (Kamili *et al.*, 2016). Aufgrund ihrer zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen, stellen die Galektine Zielstrukturen für die Arzneimittelforschung, insbesondere in der Tumorthherapie, dar (Ahmed und AlSadek, 2015).

Für die kinetische Interaktionsmessung am BLI wurden das Galektin-3 und das zellfrei exprimierte Galektin-1 eingesetzt. Die Interaktionsstudien wurden für Galektin-3 mit dem AGP<sub>Nativ</sub>, AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub>, AGP<sub>Oxal</sub> und einem AGP<sub>Alk/Oxal</sub> von *Ginkgo biloba* durchgeführt. Durch die Hydrolyseprozesse kommt es zu einer Erhöhung des Galactoseanteils bei gleichzeitiger Abnahme des Molekulargewichtes. So zeigt das AGP<sub>Nativ</sub> ein Galactosegehalt von 26,9%, das AGP<sub>Oxal</sub> ein von 41,2% und AGP<sub>Alk/TFA</sub> ein Gehalt von 61,1%. Da Vorversuche von dem AGP<sub>Alk/Oxal</sub> aus *Echinacea purpurea* mit verschiedenen Galektinen sehr gute Ergebnisse aufzeigten, wurde dieses AGP als Interaktionspartner für das zellfrei exprimierte Galektin-1 gewählt.

Die Bindung von Pektin-Polysacchariden an Galektin-3 ist bereits mehrfach beschrieben worden, so zeigt Citruspektin in der nativen Form aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit keine Reaktion mit Galektin-3. Nach Hydrolyseprozess zeigen Fragmente des Citruspektins, modifiziertes Citruspektin (MCP) genannt, eine Ligandenfunktion (Nangia-Makker *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen sind mit AGs mit modifiziertem Citruspektin aus *Panax*

*notoginseng* und Galektin-3 (Lu *et al.*, 2017) sowie dem Ginseng-Pektin und Galektin-13 mittels BLI untersucht worden (Su *et al.*, 2018). Die Rhamnogalacturonan-I (RG-I) Region aus Citruspektin besitzen größere Mengen von linearen  $\beta$ -1,4-D-Galactanketten, die eine sehr gute Affinität zu der CRD von Galektin-3 aufweisen (Gunning *et al.*, 2009). Bei Untersuchungen der Bindungsaffinität mittels BLI konnten Zhang *et al.* (2016) eine starke Bindung zwischen Galektin-3 und RG-I nachweisen ( $K_D$ : 0,095  $\mu$ M). Der  $K_D$ -Wert mit MCP lag hingegen bei 14,78  $\mu$ M, welches in einem unterschiedlich starken Bindungsverhalten der einzelnen Strukturelemente von MCP an Galektin-3 begründet liegen könnte (Zhang *et al.*, 2016). Weiterhin untersuchten Zhang *et al.* (2017) das Bindungsverhalten mittels BLI von Galektin-3 mit RG und mit zwei HGs, bei welchem eine stärkere Bindung mit RG beobachtet wurde.

Weiterhin sind Interaktionsstudien in Bezug auf das Bindungsverhalten der CRDs der Galektine-1 und -3 mit großen Polysacchariden wie  $\alpha$ -Galactomannanen (60 kDa) sowie Rhamnogalacturonan (120 kDa) durchgeführt worden (Dings *et al.*, 2018).

Über die Interaktion von Galektinen mit AGs bzw. AGPs ist nur sehr wenig bekannt. André *et al.* (2015) konnten eine Interaktion von Lärchen AGs und deren Partialhydrolysen (Oxalsäurehydrolyse und TFA-Hydrolyse) mit verschiedenen Galektinen in einem zellbasierten Assay nachweisen. So nahm die Bindungsaffinität der Galektine-1 und -3 in Abhängigkeit der Zunahme des freigelegten 1,3,6-Galactoseeinheiten im *Backbone* zu. Diese Daten zeigen, dass das komplexe Interaktionsverhalten von sehr vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist.

Die Ergebnisse der Messung von Galektin-3 mit allen genutzten *Ginkgo biloba* AGPs zeigen eine Interaktion bei einer sehr geringen unspezifischen Bindung der AGPs an die SA-Sensoren.

Das AGP<sub>Nativ</sub>, das AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> und das AGP<sub>Oxal</sub> zeigen hierbei in der durchgeführten Einfachmessung ein sehr ähnliches Bindungsverhalten, dennoch sind leichte Tendenzen zu erkennen, dass das native AGP die stärkste Bindung aufweist. Hierbei wurde erwartet, dass das AGP<sub>Alk/Oxal</sub> eine stärkere Bindung zeigt, bedingt durch das Freilegen von weiteren Galactoseeinheiten durch die Abspaltung von Arabinosen, welches jedoch nicht bestätigt werden konnte. Aufgrund der durchgeführten Einfachmessungen konnte kein  $K_D$ -Wert ermittelt werden und es bedarf der Durchführung von weiteren Untersuchungen. Als Begründung

für die stärkere Interaktion des nativen AGPs mit Galektin-3 wäre die große Anzahl an großen  $\beta$ -1,4-Galactose-Seitenketten anzuführen. Ebenso könnten terminale furanosidische Arabinoseeinheiten in den Seitenketten die Bindungspartner durch unterschiedliche Mechanismen stabilisieren, welche bei den partialhydrolysierten AGPs fehlen würden. Aus den Ergebnissen kann vermutet werden, dass sowohl Galactoseeinheiten als auch Arabinoseeinheiten für die Interaktion verantwortlich sind. Für ein Rhamnogalacturonan konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Galektin-3 sowohl über die CRD-Region als auch über die N-terminale Aminosäurekette erfolgt (Miller *et al.*, 2017).

Das AGP<sub>Alk/TFA 0,2</sub> interagiert am schwächsten. Vermutlich sind durch die Säurehydrolyse entscheidende Galactosebindungsstellen abgespalten worden. Sehr schön zeigt sich die konzentrationsabhängige Interaktion von dem AGP<sub>Alk/Oxal</sub> hydrolysierten AGP von *Ginkgo biloba* mit Galektin-3, für welche ein  $K_D$ -Wert bei einem *bivalenten Fitting* von 0,106  $\mu$ M ermittelt werden konnte. Damit konnte mit diesem AGP eine gute Interaktion mit Galektin-3 nachgewiesen werden.

Für eine weitere Interaktionsstudie wurde das AGP<sub>Alk/Oxal</sub> von *Echinacea purpurea* mit dem zellfrei exprimierten Galektin-1 genutzt. Der durchgeführte Westernblot bestätigte eine erfolgreiche zellfreie Expression (3.2.2.). Diese zellfreie Expression wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Beitz, Abteilung der Pharmazeutisch-Medizinischen Chemie, Pharmazeutisches Institut der CAU zu Kiel durchgeführt, dessen Forschungsschwerpunkte auch das Arbeiten mit der zellfreien Proteinsynthese umfasst (Hajek *et al.*, 2019; Helmstetter *et al.*, 2019).

Die gemessene Konzentration des Proteins mittels Bradford-Reagenz lag bei geringen 147  $\mu$ g/ml. Die Auswertung des SDS-Gels ergab, dass eine hohe Konzentration noch auf den *beads* gebunden war. Damit hätte das Elutionsverhalten noch deutlich optimiert werden müssen, um eine höhere Ausbeute zu gewinnen.

Das native AGP von *Echinacea purpurea*, welches als Ligand mit unterschiedlichen Konzentrationen genutzt wurde, besteht im *Backbone* aus 1,3-Galactoseeinheiten, die an Position 6 Verknüpfungen mit 1,6-Galp und 1,5-Araf zeigen. Als terminale Gruppe kommt 1-Araf vor (Classen *et al.*, 2000). Die alkalische Hydrolyse bewirkt eine Abspaltung des Proteinanteils, bei der die für die Verknüpfung verantwortliche Aminosäure erhalten bleibt. Die Oxalsäure

Hydrolyse bewirkt eine Abspaltung labiler terminaler furanosidischer Arabinosen. Damit besteht der Kohlenhydratanteil im Wesentlichen aus 1,3,6-Galp, 1,3-Galp sowie 1,6-Galp bei einem geringeren Molekulargewicht. Bei dieser Interaktion konnte ein  $K_D$ -Wert bei einem *1:1 Fitting* von 1,41  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Welche Strukturen für die Interaktion zuständig sind, ist nicht bekannt. Der  $K_D$  Wert eher als Tendenz zu betrachten. So ist unklar, ob die gesamte Funktionsfähigkeit des Galektins bei der zellfreien Expression hergestellt werden konnte und inwiefern die Lagerung einen negativen Einfluss auf dieses hatte. Für aussagekräftigere Werte hätten Mehrfachversuche mit unterschiedlichen Probenkonzentrationen durchgeführt werden müssen sowie vergleichende Untersuchungen mit anderen nativen AGPs und partialhydrolysieren AGPs.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass diese Interaktionsstudien eine vielversprechende Tendenz der Interaktionen der humanen Galektine-1 und -3 mit verschiedenen AGPs aufzeigen. So scheinen die AGPs von *Ginkgo biloba* und *Echinacea purpurea* entscheidende Strukturmerkmale zu besitzen, die eine Interaktion möglich machen, die aber noch explizit und umfassend erforscht werden müssen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Arabinogalactan-Proteine (AGPs) sind Signalmoleküle der pflanzlichen Zellwand mit vielfältigen Funktionen. Während die strukturelle Charakterisierung dieser Glykoproteine für die Angiospermen bereits sehr umfassend bearbeitet wurde, gibt es bisher wenig Wissen über das Vorkommen und die Struktur dieser Moleküle in Gymnospermen. Des Weiteren fehlt es in der Literatur teilweise an einer klaren Abgrenzung gegenüber den Arabinogalactanen (ohne Proteinanteil), die im Holz einiger Gymnospermen in großer Menge vorkommen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Arabinogalactan-Proteine (AGPs) aus den Gymnospermen *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya*, *Cycas revoluta* und *Encephalartos longifolius* isoliert und charakterisiert. Die Untersuchung der AGPs bietet interessante Einblicke zu deren evolutionärer Entwicklung.

Der Proteingehalt der drei AGPs lag zwischen 5,0-7,5% und damit im Bereich der AGPs der Angiospermen. Die Aminosäure Hydroxyprolin, die in AGPs normalerweise für die Bindung des Polysaccharidanteils verantwortlich ist, findet sich im Proteinanteil von *Ginkgo* und *Ephedra* mit Mengen von 6-10% (*Ginkgo biloba*: 6,8%, *Ephedra distachya*: 9,5%) im Bereich der Angiospermen-AGPs, während bei *Cycas revoluta* der Hydroxyprolinanteil mit 22,5% auffällig hoch ist.

Der Kohlenhydratanteil aller untersuchten AGPs zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Arabinose aus. Während bei AGPs aus Angiospermen Galactose meist deutlich überwiegt, zeigen alle Gymnospermen-AGPs ein ungefähr ausgeglichenes Ara:Gal-Verhältnis. Ein besonderes Merkmal der untersuchten AGPs (mit Ausnahme des *Cycas revoluta* AGPs) ist das Vorkommen terminaler 3-O-Methyl-Rhamnose – ein Monosaccharid, welches in AGPs und auch anderen Polysacchariden der Angiospermen nicht vorkommt, in Gymnospermen-AGPs bisher nicht beschrieben wurde und in letzter Zeit in AGPs verschiedener Moose und Farne nachgewiesen werden konnte.

Der Kohlenhydratstrukturen der AGPs von *Ephedra distachya* und *Cycas revoluta* weisen den typischen Aufbau eines AGs Typ II auf mit dem Hauptverzweigungspunkt 1,3,6-Galactose und einem auffällig hohen Gehalt an terminaler Arabinose. 3-O-Methyl-Rhamnose konnte nur in dem AGP von *Ephedra distachya* und in jenem von *Encephalartos longifolius*

gefunden werden. Die absoluten Molekulargewichte liegen mit 130-185 kDa im Bereich der AGPs der Angiospermen (*Ephedra distachya*: 132,6 kDa, *Cycas revoluta*: 180,9 kDa).

Im Gegensatz dazu zeigt das *Ginkgo*-AGP ungewöhnliche Strukturmerkmale. Es zeichnet sich in den Grundzügen durch die klassischen Monosaccharidstrukturen eines Typ II-Arabinogalactans in der Galactan-Hauptkette wie 1,3,6-Galp, und 1,3-Galp aus. In den Seitenketten zeigen sich auffällig große Mengen an 1,5-Araf und 1-Araf. Zusätzlich wurde der ungewöhnliche Zucker 3-O-Methyl-Rhamnose als Endgruppe nachgewiesen. Interessanterweise konnte ein sehr hoher Gehalt von 1,4-Galp nachgewiesen werden, welche ein typischer Bestandteil eines AGs vom Typ I ist. Das absolute Molekulargewicht des *Ginkgo*-AGPs ist mit ca. 520 kDa auffällig groß.

Ein neues medizinisches Target, insbesondere in der Tumorthherapie, stellen humane Galektine dar, die galactanhaltige Strukturen binden. Aus diesem Grund kommen auch pflanzliche Galactane als potentielle Galektin-Inhibitoren in Frage. Mittels der Bio-Layer-Interferometrie wurden daher kinetische Interaktionsstudien zum Nachweis der Bindung von AGPs an die Galektine-1 und -3 durchgeführt. Dazu wurde Galektin-1 zellfrei exprimiert (Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz) und die Bindung an ein partialhydrolysiertes AGP aus *Echinacea purpurea* nachgewiesen ( $K_D=1,41 \mu\text{M}$ ). Das native *Ginkgo*-AGP und dessen verschiedene partialhydrolysierte Derivate mit höherem Galactangehalt und geringeren Molekulargewichten wurden auf Interaktionen mit humanem Galektin-3 untersucht. Dabei zeigte das native AGP die höchste Bindungsaffinität, evtl. bedingt durch eine zusätzliche Bindungsstelle am Galektin außerhalb der CRD, wie es kürzlich für ein Rhamnogalacturonan ermittelt wurde.

## 6. SUMMARY

Arabinogalactan proteins (AGPs) are signaling molecules of the plant cell wall with a variety of functions. For the angiosperms, the structures of these glycoproteins have already been investigated extensively, whereas there is little knowledge about the occurrence and structural composition of these molecules in gymnosperms. Furthermore, literature does not provide a clear separation from arabinogalactans (without a protein content), which are found in large quantities in the wood of some gymnosperms. For this reason, AGPs from the gymnosperms *Ginkgo biloba*, *Ephedra distachya*, *Cycas revoluta* and *Encephalartos longifolius* were isolated and characterized. These studies of gymnosperm-AGPs offers interesting insights into their evolutionary development.

The protein content of the three AGPs (*Ginkgo*, *Ephedra*, *Cycas*) is between 5.0-7.5% and thus in the range of the AGPs of angiosperms. For *Ginkgo biloba*: 6.8% and *Ephedra distachya*: 9.5%, the amount of the amino acid hydroxyproline, which is normally responsible for binding the polysaccharide fraction, is, with amounts of 6-10%, comparable to that of angiosperm-AGPs. In contrast, the hydroxyproline fraction is conspicuously high (22.5%) in the *Cycas revoluta* AGP.

The carbohydrate content of all examined AGPs is characterized by a high amount of arabinose. Galactose predominates most angiosperms-AGPs, whereas all investigated gymnosperm-AGPs showed comparatively balanced Ara:Gal ratios. An interesting feature of the AGP (with the exception of the *Cycas revoluta* AGP) was the occurrence of terminal 3-*O*-Methyl-Rhamnose, a monosaccharide which does not occur in AGPs and other polysaccharides of angiosperms and has not yet been described in gymnosperm-AGPs. However, the occurrence of 3-*O*-Me-Rhap in different mosses and ferns has been recently reported. The carbohydrate structures of the AGPs from *Ephedra distachya* and *Cycas revoluta* show the typical structure of a type II AG, which is 1,3,6-Galp as the main branch point and a high amount of terminal arabinose. 3-*O*-Me-Rhap was only found in the AGPs of *Ephedra distachya* and *Encephalartos longifolius*. The absolute molecular weights of 130-185 kDa are comparable to those of the angiosperm-AGPs (*Ephedra distachya*: 132.6 kDa, *Cycas revoluta*: 180.9 kDa). In contrast, the AGP of *Ginkgo biloba* showed unusual structural features. The main galactan chain is characterized by the classical monosaccharide structures of a



---

type II arabinogalactan, like 1,3,6-Galp and 1,3-Galp, accompanied by high amounts of 1,5-Araf and 1-Araf. Additionally, the unusual terminal monosaccharide 3-O-Me-Rhap was also detected. Interestingly, a very high content of 1,4-Galp was detected, which is a typical component of a type I arabinogalactans. The absolute molecular weight of the *Ginkgo*-AGP (520 kDa) is very high.

A new medical target, especially in tumor therapy, are human galectins, which bind galactan structures. Consequently, herbal galactans can also be considered as potential galectin inhibitors. Therefore, kinetic interaction studies were performed by utilising bio-layer-interferometry to investigate the binding of AGPs to galectin-1 and -3. For this purpose, a cellfree galectin-1 was expressed (cooperation with working group of Prof. Dr. Eric Beitz, CAU Kiel) and a binding to a partial hydrolyzed AGP from *Echinacea purpurea* was detected ( $K_D=1.41\ \mu\text{M}$ ). The native *Ginkgo*-AGP and the various partially hydrolyzed AGP-derivates with high galactan content and lower molecular weights were investigated for interactions with human galectin-3. The native AGP showed the highest binding affinity, which could be a result of an additional binding site on the galectin outside of the CRD, comparable to the one that was recently found for a rhamnogalacturonan.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Abourashed EA, El-Alfy A, Kahn IA und Walker L (2003)** Ephedra in Perspective – a Current Review. *Phytotherapie Research* 17, S. 703-712.

**Ahlemeyer B, Selke D, Schaper C, Klumpp S und Krieglstein (2001)** Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *European Journal of Pharmacology* 430, S. 1-7.

**Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F und Brewe CF (2004)** Galectin-3 Precipitates as a Pentamer with Synthetic Multivalent Carbohydrates and Forms Heterogeneous Cross-linked Complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 279(12), S. 10847-10847.

**Ahmed H und AlSadek DMM (2015)** Galectin-3 as a Potential Target to Prevent Cancer Metastasis. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 9, S. 113-121.

**Alban S, Classen B, Brunner G und Blaschek W (2002)** Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. *Planta Medica* 68(12), S. 1118–1124.

**Altaner CM, Tokareva EN, Jarvis MC und Harris PJ (2010)** Distribution of (1→4)- $\beta$ -galactans, arabinogalactan proteins, xylans and (1→3)- $\beta$ -glucans in tracheid cell walls of softwoods. *Tree Physiology* 30, S. 782-793.

**Anderson DMW und Munro (1969)** The Presence of 3-O-Methylrhamnose in *Araucaria* resinous exudates. *Phytochemistry* 8, S. 633-634.

**André S, Classen B und Gabius HJ (2015)** Studies on Unprocessed and Acid-Treated Arabinogalactan from Larch as an Inhibitor of Glycan Binding of a Plant Toxin Biomedically Relevant Human Lectins. *Planta medica* 81, S. 1146-1153.

**Aoki S, Uehara K, Imafuku M, Hasebe M und Ito M (2004)** Phylogeny and divergence of basal angiosperms inferred from APETALA3- and PISTILLATA-like MADS-box genes. *Journal of Plant Research* 117, S. 229-244.

**Argueso P, Mauris J und Uchino Y (2015)** Galectin-3 as a regulator of the epithelial junction: Implications to wound repair and cancer. *Tissue barriers* 3(3), Artikelnummer: e1026505.

**Aspinall GO (1973)** Carbohydrate polymers of plant cell walls. In: Leowus F (Hrsg.), Biogenesis of plant cell wall polysaccharides. Academic Press, S. 95–115.

**Ban C, Park JB, Cho S, Kim YR, Kim YJ, Bae H, Kim C, Kang H, Jang D, Shin YS, Kim DO, Kim H und Kweon DH (2020)** Characterization of *Ginkgo biloba* Leaf Flavonoids as Neuroexocytosis Regulators. *Molecules* 25(8), Artikelnummer: 1829.

**Bartels D, Baumann A, Maeder M, Geske T, Heise EM, von Schwartzberg K und Classen B (2017)** Evolution of plant cell wall: Arabinogalactan-proteins from three moss genera show structural differences compared to seed plants. *Carbohydrate Polymers* 163, S. 227–235.

**Bartels D und Classen B (2017)** Structural investigations on arabinogalactan-proteins from a lycophyte and different monilophytes (ferns) in the evolutionary context. *Carbohydrate Polymers* 172, S. 342–351.

**BfArM-Mitteilung:** <https://www.bfarm.de/DE/Bundesopiumstelle/Grundstoffe/Mitteilungen/docs/Ephedra.html>

**Bi S, Earl LA, Jacobs L und Baum LG (2008)** Structural Features of Galectin-9 and Galectin-1 That Determine Distinct T Cell Death Pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 283(18), S. 12248–12258.

**Bibens-Laulan N und St-Pierre Y (2017)** Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7. *PLoS ONE* 12(11), Artikelnummer: e0187194.

**Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ und Stone BA (1983)** A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*. 113, S. 291–299.

**Blumenkrantz N und Asboe-Hansen G (1973)** New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54(2), S. 484–489.

**Bobalek JF und Johnson MA (1983)** Arabinogalactan-Proteins from *Douglas Fir* and *Loblolly Pine*. *Phytochemistry* 22(6), S. 1500–1503.

**Brenner ED, Stevenson DW und Twigg RW (2003)** Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *Trends in Plant Science* 8(9), S. 1360–1385.

- Broeker J, Mechelke M, Baudrexl M, Mennereich D, Hornburg D, Mann M, Schwarz WH, Liebl W und Zverlov VV (2018)** The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercoarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. *Biotechnology for Biofuels* 11, Artikelnummer 229.
- Brown CE, Trauth S, Grippo RS, Gurley BJ und Grippo AA (2012)** Combined Effects of Ephedrine-Containing Dietary Supplements, Caffeine, and Nicotine on Morphology and Ultrastructure of Rat Hearts. *Journal of Caffeine Research* 2(3), S. 123-132.
- Bumba L, Laaf D, Spiwok V, Elling L, Kren V und Bojarova (2018)** Poly-N-Acetylactosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling. *International Journal of Molecular Sciences* 19, Artikelnummer; 372.
- Bum Park Y und Cosgrove DJ (2014)** Xyloglucan and its Interactions with Other Components of the Growing Cell Wall. *Plant Cell Physiology* 56(2), S. 180-194.
- Busse-Wicher M, Li A, Silveira RL, Pereira CS, Tryfona T, Gomes TCF, Skaf MS und Dupree P (2016)** Evolution of Xylan Substitution Patterns in Gymnosperms and Angiosperms: Implications for Xylan Interaction with Cellulose. *Plant Physiology* 171, S. 2418-2431.
- Bürger A, Filsinger S, Cooper DNW und Hänsch GM (1996)** Expression of the 14 kDa galactose-binding protein, galectin-1, on human tubular epithelial cells. *Kidney International* 50, S. 754-759.
- Chang ACG, Chen T, Li N und Duan J (2019)** Perspectives on Endosymbiosis in Coralloid Roots: Association of Cycads and Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 10, Artikelnummer: 1888.
- Cheng JS, Lei C, Wu JC und Yuan YJ (2008)** Expression of arabinogalactan proteins involved in Taxol production by immobilized *Taxus cuspidata* cells. *Journal of Biotechnology* 133, S. 96-102.
- Chen KM, Wu GL, Wang YH, Tian CT, Samaj J, Baluska F und Lin JX (2008)** The block of intracellular calcium release affects the pollen tube development of *Picea wilsonii* by changing the deposition of cell wall components. *Protoplasma* 233, S. 39-49.
- Chen X, Jin C, Wang P, Chen PW, Zhang X, Li J, Gong C und Wang A (2018)** Genome-wide analysis and endo- $\beta$ -mannanase gene family expression profiling of tomato and soybean. *Nordic Journal of Botany* 36(6), Artikelnummer: e01580.

**Chetry M, Thapa S, Hu X, Song Y, Zhang J, Zhu H und Zhu X (2018)** The Role of Galectins in Tumor Progression, Treatment and Prognosis of Gynecological Cancers. *Journal of Cancer* 9(24), S. 4742-4755.

**Chien CTH, Ho MR, Lin CH und Hsu STD (2017)** Lactose Binding Induces Opposing Dynamics Changes in Human Galectins Revealed by NMR-Based Hydrogen–Deuterium Exchange. *Molecules* 22(8), Artikelnummer 1357.

**Classen B, Csavas M, Borbas A, Dingermann T und Zündorf I (2004)** Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*. *Planta Medica* 70(9), S. 861–865.

**Classen B, Thude S, Blaschek W, Wack M und Bodinet C (2006)** Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. *Phytomedicine* 13(9- 10), S. 688–694.

**Classen B, Witthohn K und Blaschek W (2000)** Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of *Echinacea purpurea* by precipitation with the  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent. *Carbohydrate Research* 327, S. 497-504.

**Clarke AE, Anderson RL und Stone BA (1979)** Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18, S. 521–540.

**Costa M, Pereira AM, Rudall PJ und Coimbra S (2013)** Immunolocalization of arabinogalactan proteins (AGPs) in reproductive structures of an early-divergent angiosperm, *Trithuria* (Hydatellaceae). *Annals of Botany* 111, S. 183-190.

**Cousin JM und Cloninger MJ (2016)** The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *International Journal of Molecular Sciences* 17, Artikelnummer: 1566.

**Danciu C, Muntean D, Alexa E, Farcas C, Oprean C, Zupko I, Bor A, Minda D, Proks M, Buda V, Hancianu M, Cioanca O, Soica C, Popescu S und Dehelean CA (2019)** Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antimicrobial, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Potential of *Ephedra alata* Decne. Hydroalcoholic Extract against the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Molecules* 24, Artikelnummer: 13.

**Davis CC und Schaefer H (2011)** Plant Evolution: Pulses of Extinction and Speciation in Gymnosperm Diversity. *Current Biology* 21(24), S. R995-R998.

**DeFeudis FV, Papadopoulos V und Drieu K (2002)** *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 17, S. 405-417.

**De La Torre A, Piot A, Liu B, Wilhite B, Weiss M und Porth I (2019)** Functional and morphological evolution in gymnosperms: A portrait of implicated gene families. *Evolutionary Applications* 13(4), S. 210-227.

**Dengler B, Glasl H., Groebel W, Hörhammer L, Iyengar MA, List PH, Mühlenrbuch B, Rattenberger M, Rönsch G, Roth H, Schaette R, Schmid W, Surborg KH, Wagner H und Aurnhammer G (2013)** Chemikalien und Drogen (CI-G) Band 4 von Handbuch der Pharmazeutischen Praxis- Vollständig (4.) Neuauflage. Springer Verlag, S. 781.

**Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin DA, Vasta GR und Rabinovich GA (2011)** When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again. *Biochemistry* 50(37), S. 7842-7857.

**Dings RPM, Miller MC, Griffin RJ und Majo KH (2018)** Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *International Journal of Molecular Sciences* 19, Artikelnummer: 905.

**Dion C, Chappuis E und Ripoll C (2016)** Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. *Nutrition & Metabolism* 13, Artikelnummer 28.

**Donaldson LA und Knox JP (2012)** Localization of Cell Wall Polysaccharides in Normal and Compression Wood of Radiata Pine: Relationships with Lignification and Microfibril Orientation1. *Plant Physiology* 158, S. 642-653.

**Downie DA, Donaldson JS und Oberprieler RG (2008)** Molecular systematics and evolution in an African cycad-weevil interaction: Amorphocerini (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae) weevils on *Encephalartos*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, S. 102-116.

**Dumic J, Dabelic S und Flögel M (2006)** Galectin-3: An open-ended story. *Biochemica et Biophysica Acta* 1760(4), S. 616-635.

**Earl LA, Bi S und Baum LG (2010)** Galectin multimerization and lattice formation are regulated by linker region structure. *Glycobiology* 21(1), S. 6-12.

**Egelund J, Skjot M, Geshi N, Ulvskov P und Petersen BL (2004)** A Complementary Bioinformatics Approach to Identify Potential Plant Cell Wall Glycosyltransferase-Encoding Genes. *Plant Physiology* 136, S. 2609-2620.

**Egertsdotter U und von Arnold S (1995)** Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) *Physiologia Plantarum* 93, S. 334-345.

**Ellis M, Egelund J, Schultz CJ und Bacic A (2010)** Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface?. *Plant Physiology* 153, S. 403-419.

**Ellnain-Wojtaszek M, Kruczynski Z und Kasprzak (2003)** Investigation of the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves. *Fitoterapia* 74, S. 1-6.

**Evert RF (2009)** Esaus Pflanzenanatomie: Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung, Walter de Gruyter, S. 61.

**Fan Y, Li J, Yin Q, Zhang Y, Xu H, Shi X, Li C, Zhaou Y und Zhou C (2015)** Effect of extractions from *Ephedra sinica* Stapf on hyperlipidemia in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine* 9, S. 619-625.

**Fernando DD, Quinn CR, Brenner ED und Owens JN (2010)** Male Gametophyte Development and Evolution in Extant Gymnosperms. *International Journal of Plant Developmental Biology* 4(1), S. 47-63.

**Fincher GB, Stone BA und Clarke AE (1983)** Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. *Annual Review of Plant Physiology* 34, S. 47–70.

**Fintelmann V und Weiss RF (2009)** Lehrbuch Phytotherapie, Georg Thieme Verlag, S. 152.

**Forest F, Moat J, Baloch E, Brummitt N, Bachmann SP, Ickert-Bond S, Hollingsworth PM, Liston A, Little DP, Mathews S, Rai H, Rydin C, Stevenson DW, Thomas P und Buerki S (2018)** Gymnosperms on the EDGE. *Scientific Reports* 8, Artikelnummer: 6053.

**Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, Stelling MP und Pavao MSG (2014)** Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Frontiers in Oncology* 4, Artikelnummer: 138.

**Fu H, Yadav MP und Nothnagel EA (2007)** *Physcomitrella patens* arabinogalactan proteins contain abundant terminal 3-O-methyl-L-rhamnosyl residues not found in angiosperms. *Planta* 226, S. 1511-1524.

**Furneaux RH und Stevenson TT (1990)** The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). In: Lindstrom SC, Gabrielson PW (Hrsg.), Thirteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands, S. 615–620.

**Gao M und Showalter AM (1999)** Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *The Plant Journal* 19(3), S. 321-331.

**Gao X, Zhi Y, Peng X, Zhang T, Xue H, Tai G und Zhou Y (2013)** The Inhibitory Effects of a Rhamnogalacturonan (RG-I) Domain from Ginseng Pectin on Galectin-3 and Its Structure-Activity Relationship. *The Journal of Biological Chemistry* 288(47), S. 33953-33965.

**Gauthier S und Schlaefke S (2014)** Efficacy and Tolerability of *Ginkgo biloba* Extract EGb 761® in Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. *Clinical Interventions in Aging* 28, S., 2065-2077.

**Gawkowska D, Cybulska J und Zdunek A (2018)** Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review. *Polymers* 10, Artikelnummer 762.

**Gemeinholzer B (2018)** Systematik der Pflanzen kompakt. Springer Verlag, S. 136; S. 138-140.

**Gelbe Liste:** [https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Ephedrin\\_10012](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Ephedrin_10012)

**Ghosh K, Ray S, Ghosh D und Ray B (2015)** Chemical structure of the arabinogalactan protein from gum ghatti and its interaction with bovine serum albumin. *Carbohydrate Polymers* 117, S. 370-376.

**Gleeson PA und Clarke AE (1979)** Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein. *Biochemical Journal* 181(3), S. 607– 621.

**Gleeson PA und Jermyn MA (1979)** Alteration in the Composition of  $\beta$ -Lectins Caused by Chemical and Enzymic Attack. *Australian Journal of Plant Physiology* 6(1), S. 25-38.

**Goellner MH (2009)** Untersuchungen zu Arabinogalactan-Proteinen aus *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L. und *Avena sativa* L.. Dissertation.

**Goellner EM, Blaschek W und Classen B (2010)** Structural Investigations on Arabinogalactan-Protein from Wheat, Isolated with Yariv Reagent *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, S. 3621-3626.

**Goellner EM, Utermohlen J, Kramer R und Classen B (2011)** Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans. *Carbohydrate Polymers* 86, S. 1739-1744.



**Gorrod ARN und Jones JKN (1954)** The Hemicelluloses of *Scots Pine* (*Pinus sylvestris*) and *Black Sprue* (*Picea nigra*) Woods. *Journal of the Chemical Society*, S. 2522-2525.

**Guan Y und Nothnagel EA (2004)** Binding of Arabinogalactan Proteins by Yariv Phenylglycoside Triggers Wound-Like Responses in Arabidopsis Cell Cultures. *Plant Physiology* 135, S. 1346-1366.

**Gunning AP, Bongaerts RJM und Morris VJ (2009)** Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *The FASEB Journal* 23, S. 415-424.

**Hajek P, Bader A, Helmstetter F, Henke B, Arnold P und Beitz E (2019)** Cell-Free and Yeast-Based Production of the Malarial Lactate Transporter, PfFNT, Delivers Comparable Yield and Protein Quality. *Frontiers in Pharmacology* 10, Artikelnummer: 375.

**Handford MG, Baldwin TC, Goubet FG, Prime TA, Miles J, Yu X und Depree P (2003)** Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218, S. 27-36.

**Happ K (2019)** Charakterisierung von Polysacchariden aus den Zellwänden der Armleuchteralge *Nitellopsis obtusa* und des Lebermooses *Marchantia polymorpha*. Masterarbeit.

**Happ K und Classen B (2019)** Arabinogalactan-Proteins from the Liverwort *Marchantia polymorpha* L., a Member of a Basal Land Plant Lineage, Are Structurally Different to Those of Angiosperms. *Plants* 8, Artikelnummer: 460.

**Hashiguchi M, Ohta Y, Shimizu M, Maruyama J und Mochizuki M (2015)** Meta-analysis of the efficacy and safety of *Ginkgo biloba* extract for the treatment of dementia. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences* 1, Artikelnummer: 14.

**Hassani V, Movaseghi G, Safaeeyan R, Masghati S, Yekta BG und Rad RF (2018)** Comparison of Ephedrine vs. Norepinephrine in Treating Anesthesia-Induced Hypotension in Hypertensive Patients: Randomized Double-Blinded Stud. *Anesthesia and Pain Medicine* 8(4), Artikelnummer: e79626.

**Harris PJ, Henry RJ, Blakeney AB und Stone BA (1984)** An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research* 127, S. 59–73.

**Hänsel R und Hölzl J (2013)** Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie: Ein Lehrbuch für Studenten der Pharmazie im zweiten Ausbildungsabschnitt, Springer Verlag, S. 199.

- He B, Dong H, Jiang C, Cao F, Tao S und Xu L (2016)** Analysis of codon usage patterns in *Ginkgo biloba* reveals codon usage tendency from A/U-ending to G/C-ending, Scientific Reports 6, Artikelnummer: 35927.
- He C, Wu K, Zhang J, Liu X, Zeng S, Yu Z, Zhang X, da Silva JAT, Deng R, Tan J, Luo J und Duan J (2017)** Cytochemical Localization of Polysaccharides in *Dendrobium officinale* and the Involvement of DoCSLA6 in the Synthesis of Mannan Polysaccharides. Frontiers in Plant Science 8, Artikelnummer 173.
- Helmstetter F, Arnold P, Höger B, Petersen LM und Beitz E (2019)** Formate -nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. Journal of Biological Chemistry 294, S. 623-631.
- Hijazi M, Velasquez SM, Jamet E, Estevez JM und Albenne C (2014)** An update on post-translational modification of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. Frontiers in Plant Science 5, Artikelnummer: 395.
- Hill KL, Harfe BD, Dobbins CA und L'Hernault SW (2000)** dpy-18 Encodes an  $\alpha$ -Subunit of Prolyl-4-Hydroxylase in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 155, S. 1139-1148.
- Hinz SWA, Verhoef R, Schols HA, Vincken JP und Voragen AGJ (2005)** Type I arabino-galactan contains b-D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp structural elements. Carbohydrate Research 340, S. 2135-2143.
- Hohmann N, Wolf EM, Rigault P, Zhou W, Kiefer M, Thao Y, Fu CX und Koch MA (2018)** *Ginkgo biloba*'s footprint of dynamic Pleistocene history dates back only 390,000 years ago. BMC Genomics 19, Artikelnummer: 299.
- Hsieh TJ, Lin HY, Tu Z, Huang BS, Wu SC und Lin CH (2015)** Structural Basis Underlying the Binding Preference of Human Galectins-1, -3 and -7 for Gal $\beta$ 1-3/4GlcNAc. PloS ONE 10(5), Artikelnummer: e0125946.
- Ibragic S und Sofic E (2015)** Chemical composition of various *Ephedra* species. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences 15(3), S. 21-27.
- Isah T (2015)** Rethinking *Ginkgo biloba* L.: Medicinal uses and conservation. Pharmacognosy Reviews 9(18), S. 140-148.
- Iwata T, Indrarti L und Azuma JI (1998)** Affinity of hemicellulose for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. Cellulose 5, S. 215-228.

**Jones L, Seymour GH und Knox JP (1997)** Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1→4)-β-D-Galactan. *Plant Physiology* 113, S. 1405-1412.

**Kanda A, Noda K, Saito W und Ishida S (2015)** Aflibercept Traps Galectin-1, an Angiogenic Facotr Associated with Diabetic Retinopathy. *Scientific Reports* 5, Artikelnummer: 17946.

**Kamili NA, Arthur CM, Gerner-Smidt C, Tafesse E, Blenda A, Dias-Baruffi M und Stowell SR (2016)** Key regulators of galectin–glycan interactions. *Proteomics* 16(24), S. 3111-3125.

**Kanesaki Y, Hirose M, Hirose Y, Fujisawa T, Nakamaru Y, Watanabe S, Matsunaga S, Uchida H und Murakami A (2018)** Draft Genome Sequence of the Nitrogen-Fixing and Hormonia-Inducing Cyanobacterium *Nostoc cycadae* Strain WK-1, Isolated from the Coralloid Roots of *Cycas revoluta*. *Genome Announcements* 6(7), S. 1-18.

**Karásconyi S, Kovácik V, Alföldi J und Kubacková (1984)** Chemical and C-N.M.R. studies of an arabinogalactan from *Larix sibirica* L.. *Carbohydrate Research* 134, S. 265-274.

**Karásconyi S, Patoprystý V und Kubacková M (1998)** Structural study on arabinogalactan-proteins from *Picea abies* L. *Karst. Carbohydrate Research* 307, S. 271-279.

**Kisby GE, Moore H und Spencer P (2013)** Animal Models of Brain Maldevelopment Induced by Cycad Plant Genotoxins. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 99(4), S. 247-255.

**Kishor PBK, Kumari PH, Sunita MSL und Sreenivasulu N (2015)** Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science* 6, Artikelnummer 544.

**Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, Tsumuraya Y und Kotake T (2013)** β-galactosyl Yariv reagent binds to the β-1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiology* 161(3), S. 1117–1126

**Kjeldahl J (1883)** Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 22(1), S. 366–382.

**Knox JP, Linstead PJ, Peart J, Cooper C und Roberts K (1991)** Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant Journal* 1, S. 317–326.

**Kraus J (1991)** Water-Soluble Polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves. *Phytochemistry* 30(9), S. 3017-3020.

**Kreuger M und van Holst GJ (1995)** Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 197, S. 135-141.

**Krieg C, Watkins JE, Chambers S und Husby CE (2017)** Sex-specific differences in functional traits and resource acquisition in five cycad species. *AoB Plants* 9(2), Artikelnummer: plx013.

**Lee H und Birks JS (2018)** *Ginkgo biloba* for cognitive improvement in healthy individuals. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 8, Artikelnummer: CD004671.

**Lee KJD, Sakata Y, Mau SL, Pettolino F, Bacic A, Quatrano RS, Knight CD und Knox JP (2005)** Arabinogalactan Proteins Are Required for Apical Cell Extension in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 17, S. 3051-3065.

**Lengyel S, Gove AD, Latimer AM, Majer JD und Dunn RR (2009)** Ants Sow the Seeds of Global Diversification in Flowering Plants. *PLoS ONE* 4(5), Artikelnummer: e5480.

**Léonard R, Wopfner N, Pabst M, Stadlmann J, Petersen BO, Duus J, Himly M, Radauer C, Gadermaier G, Razzazi-Fazeli E, Ferreira F und Altmann F (2010)** A New Allergen from Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) with Homology to Art v 1 from Mugwort. *The Journal of Biological Chemistry* 285(35), S. 27192-27200.

**Li M, Li B, Xia ZM, Tian Y, Zhang D, Rui WJ, Dong JX und Xiao FJ (2019)** Anticancer Effects of Five Biflavonoids from *Ginkgo biloba* L. Male Flowers In Vitro. *Molecules* 24, Artikelnummer: 1496.

**Liesche J, Martens HJ und Schulz A (2011)** Symplasmic transport and phloem loading in gymnosperm leaves. *Protoplasma* 248, S. 181-190.

**Liu AG, Smith SR, Fujioka K und Greenway F (2013)** The Effect of Leptin, Caffeine/Ephedrine and their Combination Upon Visceral Fat Mass and Weight Loss. *Obesity* 21, S. 1991-1996.

**Liu H, Ye M und Guo H (2020)** An Updated Review of Randomized Clinical Trials testing the Improvement of Cognitive Function of *Ginkgo biloba* Extract in Healthy People and Alzheimer's Patients. *Frontiers in Pharmacology* 10, Artikelnummer: 1688.

**Liu TL und Rabinovich GA (2005)** Galectins as modulators of tumor progression. *Nature reviews Cancer* 5, S. 29-41.

**Liu XW, Yang JL, Niu W, Jia WW, Olaleye QE, Wen Q, Duan XN, Huang YH, Wang FQ, Du FF, Zhong CC, Li YF, Xu F, Xu F, Gao Q, Li L und Li C (2018)** Human pharmacokinetics of *ginkgo* terpene lactones and impact of carboxylation in blood on their platelet-activating factor antagonistic activity. *Acta Pharmacologica sinica* 39(12), S. 1935-1946.

**Liu ZH, Chen J, Yu LS, Jiang HD, Yao TW und Zeng S (2009)** Structural elucidation of metabolites of ginkgolic acid in rat liver microsomes by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry and hydrogen/deuterium exchange. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23., S. 1899-1906.

**Loopstra CA, Puryear LD und No EG (1999)** Planta 210, Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine S. 686-689.

**Lu Y, Zhang M, Zhao P, Jia M, Liu B, Jia Q, Guo J, Duo L und Li J (2017)** Modified citrus pectin inhibits galectin-3 function to reduce atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Molecular Medicine Reports* 16, S. 647-653.

**Ma Y, Zeng W, Basic A und Johnson K (2018)** AGPs Through Time and Space. *Annual Plant Reviews Online*; American Cancer Society: Atlanta, S. 1–38.

**Makarova EN und Shakhmatov EG (2020)** Structural characteristics of oxalate-soluble polysaccharides from Norway spruce (*Picea abies*) foliage. *Carbohydrate Polymers* 246, Artikelnummer: 116544.

**Makarova EN, Shakhmatov EG, Udoratina EV und Kutchin AV (2015)** Structural and chemical characteristics of pectins, arabinogalactans, and arabinogalactan proteins from conifers. *Russian Chemical Bulletin* 64(6), S. 1302-1318.

**Mankga L, Yessoufou K, Mugwena T und Chitakira M (2020)** The Cycad Genus *Cycas* May Have Diversified From Indochina and Occupied Its Current Ranges Through Vicariance and Dispersal Events. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8, Artikelnummer: 44.

**Mareri L, Romi M und Cai G (2018)** Arabinogalactan proteins: actors or spectators during abiotic and biotic stress in plants?. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 153(1), S. 173-185.

**Martínez-Martínez E, Ibarrola J, Fernández-Celis A, Calvier L, Leroy C, Cachafeiro V, Ros-signal und López-Andrés N (2018)** Galectin-3 pharmacological inhibition attenuates early renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 36(2), S. 368-376.

**Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, Higuchi M, Darvill A, Albersheim P und O'Neill MA (2004)** Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants. *Plant Physiology* 134, S. 339-351.

**Miller MC, Ippel H, Suylen D, Klyosov AA, Traber PG, Hackeng T und Mayo KH (2015)** Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain. *Glycobiology* 26(1), S. 88-99.

**Miller MC, Klyosov A und Mayo KH (2009)** The  $\alpha$ -galactomannan Davanat binds galectin-1 at a site different from the conventional galectin carbohydrate binding domain. *Glycobiology* 19(9), S. 1034-1045.

**Miller MC, Nesmelova IV, Platt D, Klyosov A und Mayo KH (2009)** The carbohydrate-binding domain on galectin-1 is more extensive for a complex glycan than for simple saccharides: implications for galectin-glycan interactions at the cell surface. *Biochemistry Journal*. 421, S. 211-221.

**Miller MC, Zheng Y, Yan J, Thou Y, Tai G und Mayo KH (2017)** Novel polysaccharide binding to the N-terminal tail of galectin-3 is likely modulated by proline isomerization. *Glycobiology* 27(11), S. 1038-1051.

**Moawad A, Hetta M, Zjawiony JK, Jacob MR, Hifnawy M und Ferreira D (2010)** Phytochemical Investigation of *Cycas circinalis* and *Cycas revoluta* Leaflets: Moderately Active Antibacterial Biflavonoids. *Planta Medica* 76(8), S. 796-802.

**Mogami N, Nakamaru S und Nakamaru N (1998)** Immunolocalization of the cell wall components in *Pinus densiflora* pollen. *Protoplasma* 206, S. 1-10.

**Mohanta TK, Occipinti A, Zebelo SA, Foti M, Fliegmann J, Bossi S, Maffei ME und Berteau CM (2012)** *Ginkgo biloba* Responds to Herbivory by Activating Early Signaling and Direct Defenses. *PLoS One* 7(3). Artikelnummer: e32822.

**Mollet JC, Kim S, Jauh GY und Lord EM (2002)** Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycosid. *Protoplasma* 219, S. 89-98.

**Moneo-Sánchez M, Alonso-Chico A, Knox JP, Dopico B, Labrador E und Martín I (2019)**  $\beta$ -(1,4)-Galactan remodelling in Arabidopsis cell walls alters cellulose/xyloglucan interactions during cell elongation. *Planta* 249, S. 351–362.

**Mullaicharam AR (2013)** A Review on Evidence Based Practice of *Ginkgo biloba* in Brain Health. International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis 1(1), S. 24-30.

**Müller C (2013)** Medicinalflora: Eine Einführung in die allgemeine und angewandte Morphologie und Systematik der Pflanzen. Springer-Verlag, S. 114.

**Nadarajan J, Benson EE, Yaba P, Harding K, Lindstrom A, Donaldson J, Seal CE, Kamoga D, Agoo EM, Li N, King E und Pritchard HW (2013)** Comparative Biology of Cycad Pollen, Seed and Tissue - A Plant Conservation Perspective. Botanical Review 84, S. 295-314.

**Nakahara S und Raz A (2007)** Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. Cancer Metastasis 26(0), S. 605-610.

**Nakanishi K (2005)** Terpene trilactones from *Ginkgo biloba*: From ancient times to the 21st century. Bioorganic & Medicinal Chemistry 13, S. 4987-5000.

**Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R und Raz A (2002)** Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by oral Intake of Modified Citrus Pectin. Journal of the National Cancer Institute 94(24), S. 1854-1862.

**Nangia-Makker P, Hogan V und Raz A (2018)** Galectin-3 and cancer stemness. Glycobiology 28(4), S. 172-181.

**Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicre-Gibouin M, Mollet JC und Driouich (2012)** Arabino-galactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. Annals of Botany 110, S. 383-404.

**Nothnagel EA (1997)** Proteoglycans and related components in plant cells. International Review of Cytology 174, S. 195–287.

**Nothnagel AL und Nothnagel EA (2007)** Primary Cell Wall Structure in the Evolution of Land Plants. Journal of Integrative Plant Biology 49(8), S. 1271-1278.

**O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P und Darvill AG (2004)** Rhamnogalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. Annual Review of Plant Biology 55, S. 109-39.

**O'Rourke C, Gregson T, Murray L, Sadler IH und Fry SC (2015)** Sugar composition of the pectic polysaccharides of charophytes, the closest algal relatives of land-plants: presence of 3-O-methyl-Dgalactose residues. Annals of Botany 116(2), S. 225–236.

**Oxley D und Bacic A (1999)** Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(25), S. 14246-14251.

**Pal KB, Mahanti M, Leffler H und Nilsson UJ (2019)** A Galactoside-Binding Protein Tricked into Binding Unnatural Pyranose Derivatives: 3-Deoxy-3-Methyl-Gulosides Selectively Inhibit Galectin-1. International Journal of Molecular Sciences 20, Artikelnummer: 3786.

**Pattathil S, Avci U, Baldwin D, Swennes AG, McGill JA, Popper Z, Bootten T, Albert A, Davis RH, Chennareddy C, Dong R, O`Shea B, Rossi R, Leoff C, Freshour G, Narra R, O`neil M, York WS, Hahn MG (2010)** A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. Plant Physiology 153(2), 514–525.

**Paulsen BS, Craik DJ, Dunstan DE, Stone BA und Bacic A (2014)** The Yariv reagent: Behaviour in different solvents and interaction with a gum arabic arabinogalactanprotein. Carbohydrate Polymers 106, S. 460-468.

**Pellerin P, Vidal S, Williams P und Brillouet JM (1995)** Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. Carbohydrate Research 277, S. 135-143.

**Peralta AG, Venkatachalam S, Stone SC und Pattathil S (2017)** Xylan epitope profiling: an enhanced approach to study organ development-dependent changes in xylan structure, biosynthesis, and deposition in plant cell walls. Biotechnology for Biofuels 10, Artikelnummer: 245.

**Perillo NL, Marcus ME und Baum LG (1998)** Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. Journal of Molecular Medicine (76), S. 402-412.

**Ph. Eur. (2017)** Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2017, 9. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag, S. 2035 und 2067

**Popper ZA und Fry SC (2003)** Primary Cell Wall Composition of Bryophytes and Charophytes. Annals of Botany 91, S. 1-12.

**Punt S, Thijssen VL, Vrolijk J, de Kroon CD, Gorter A und Jordanova ES (2015)** Galectin-1, -3 and -9 Expression and Clinical Significance in Squamous Cervical Cancer. PLoS ONE 10(6), Artikelnummer: e0129119.



- Putoczki TL, Pettolino F, Griffin MDW, Möller R, Gerrad JA, Bacic A und Jackson SL (2007)** Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* Don arabino-galactan-proteins. *Planta* 226, S. 1131-1142.
- Qi W, Fong C und Lamport DTA (1991)** Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope: A new model based on O-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology* 96, S. 848–855.
- Pindur U (1978)** Zur Farbreaktion von Hydroxyprolin mit Dimethylaminobenzaldehyd. Erschienen in: *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* 166(3), S. 148-150.
- Pires ND und Dolan L (2012)** Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 367, S. 508-518.
- Popper ZA und Fry SC (2004)** Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. *New Phytologist* 164(1), S. 165–174.
- Rabinovich GA (2005)** Galectin-1 as a potential cancer target. *British Journal of Cancer* 92, S. 1188-1192.
- Rafinska K und Bednarska (2011)** Localisation pattern of homogalacturonan and arabino-galactan proteins in developing ovules of the gymnosperm plant *Larix decidua* Mill. *Sexual Plant Reproduction* 24, S. 75-87.
- Raimundo S C, Avci U, Hopper C, Pattathil S, Hahn MG und Popper ZA (2016)** Immunolocalization of cell wall carbohydrate epitopes in seaweeds: presence of land plant epitopes in *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyceae). *Planta* 243(2), S. 337–354.
- Rapoport EM und Bovin NV (2015)** Specificity of Human Galectins on Cell Surfaces. *Biochemistry* 80(7), S. 846-856.
- Ran JH, Shen TT, Wang MM und Wang XQ (2018)** Phylogenomics resolves the deep phylogeny of seed plants and indicates partial convergent or homoplastic evolution between Gnetales and angiosperms. *Proceedings of the Royal Society* 295, Artikelnummer: 20181012.
- Renard CMGC, Watrelot AA und Le Bourvellec CL (2017)** Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology* 60, S. 43-51.

- Rumyantseva NI (2005)** Arabinogalactan Proteins: Involvement in Plant Growth and Morphogenesis *Biochemistry* 70(19), S. 1073-1085.
- Ruprecht C, Bartetzko MP, Senf D, Dallabernadina P, Boos I, Andersen MCF, Kotake T, Knox JP, Hahn MG, Clausen MH und Pfrenge F (2017)** A Synthetic Glycan Microarray Enables Epitope Mapping of Plant Cell Wall Glycan-Directed Antibodies. *Plant Physiology*, 175(3), S. 1094–1104.
- Rojas P, Montes P, Rojas C, Serrano-García N und Rojas-Castaneda (2012)** Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginkgo biloba extract 761, in an animal model of Parkinson's disease: Therapeutic perspectives. *Nutrition* 28, S. 1081-1088.
- Roodt D, Lohaus R, Sterck L, Swanepoel RL, Van de Peer Y und Mizrachi E (2017)** Evidence for an ancient whole genome duplication in the cycad lineage. *PLoS ONE* 12(9), Artikelnummer: e0184454.
- Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Pokora I, Domaszewski P, Kempa K und Podgórski T (2017)** Effects of Six-Week *Ginkgo biloba* Supplementation on Aerobic Performance, Blood Pro/Antioxidant Balance, and Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor in Physically Active Men. *Nutrients* 9, Artikelnummer: 803.
- Salas-Leiva D, Meerow AW, Calonje M, Griffith MP, Francisco-Ortega J, Nakamura K, Stevenson DW, Lewis CE und Namoff S (2013)** Phylogeny of the cycads based on multiple single-copy nuclear genes: congruence of concatenated parsimony, likelihood and species tree inference methods. *Annals of Botany* 112, S. 1263-1278.
- Salomonsson E, Carlsson MC, Osla V, Hendus-Altenburger R, Kahl-Knutson B, Öberg CT, Sundin A, Nilsson R, Nordberg-Karlsson E, Nilsson UJ, Karlsson A, Rini JM und Leffler H (2010)** Mutational Tuning of Galectin-3 Specificity and Biological Function. *The Journal of Biological Chemistry* 285(45), S. 35079-35091.
- Samaj J, Salaj T, Matúsová R, Salaj J, Takác T, Samajová O und Volkmann D (2007)** Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential. *Plant Cell Reports* 27, S. 221-229.
- Sanchez C, Schmitt C, Kolodziejczyk E, Lapp A, Gaillard C und Renard D (2007)** The acacia gum arabinogalactan fraction is a thin oblate ellipsoid: A new model based on small-angle neutron scattering and ab initio calculation. *Biophysical Journal* 94(2), S. 629– 639.

**Saraboji K, Håkansson M, Genheden S, Diehl C, Qvist J, Weininger U, Nilsson UJ, Leffler H, Ryde U, Akke M und Logan DT (2012)** The Carbohydrate-Binding Site in Galectin-3 Is Pre-organized To Recognize a Sugarlike Framework of Oxygens: Ultra-High-Resolution Structures and Water Dynamics. *Biochemistry* 51(1), S. 296-306.

**Sarkar P, Bosneaga E und Auer M (2009)** Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany* 60, S. 3615-3635.

**Sato K, Hara K, Yoshimi Y, Kitazawa K, Ito H, Tsumuraya Y und Kotake T (2018)** Yariv reactivity of type II arabinogalactan from larch wood. *Carbohydrate Research* 467, S. 8-13.

**Schneider D, Wink M, Sporer F und Lounibos P (2002)** Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften* 89, S. 281-294.

**Schwarz D, Junge F, Durst F, Fröhlich N, Schneider B, Reckel S, Sobhanifar S, Dötsch V und Bernhard F (2007)** Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nature Protocols* 2, S. 2945-2957.

**Seifert GJ und Roberts K (2007)** The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58, S. 137-161.

**Sénéchal F, Wattiert C, Rustérucci C und Pelloux J (2014)** Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany* 65(18), S. 5125-5160.

**Shi C, Liu J, Wu F und Yew DT (2010)** *Ginkgo biloba* Extract in Alzheimer's Disease: From Action Mechanisms to Medical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, S. 107-123.

**Shi H, Yu L, Lu J, Teng H, Zhou Y und Sun L (2017)** Structural Characterization of a Rhamnogalacturonan I Domain from Ginseng and Its Inhibitory Effect on Galectin-3. *Molecules* 22, Artikelnummer 2016.

**Showalter AM und Basu D (2016)** Glycosylation of arabinogalactan-proteins essential for development in Arabidopsis. *Communicative & Integrative Biology* 0, Artikelnummer: e1177687.

**Showalter AM (1993)** Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *The Plant Cell* 5, S. 9-23.

**Showalter AM (2001)** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. Cellular And Molecular Life Sciences 58, S. 1399-1417.

**Stegemann H und Stalder K (1967)** Determination of hydroxyproline. Clinica Chimica Acta 18, S. 267–273.

**Stegmayer J, Lepur A, Kahl-Knutson B, Aguilar-Moncayo M, Klyosov AA, Fiield RA, Oredsson S, Nilsson UJ und Leffler H (2016)** Low or No Inhibitory Potency of the Canonical Galectin Carbohydrate-binding Site by Pectins and Galactomannans. The Journal of Biological Chemistry 291(25), S. 13318-13334.

**Stegmayr J, Zetterberg F, Carlsson MC, Huang X, Sharma G, Kahl-Knutson B, Schambye H, Nilsson UJ, Oredsson S und Leffler H (2019)** Extracellular and intracellular small-molecule galectin-3 inhibitors. Scientific Reports 9, Artikelnummer: 2186.

**Steinwand BJ und Kieber JJ (2010)** The Role of Receptor-Like Kinases in Regulating Cell Wall Function. Plant Physiology 153, S. 479-484.

**Stohs SJ und Badmaev Y (2016)** A Review of Natural Stimulant and Non-stimulant Therapeutic Agents. Phytiotherapie Research 30, S. 732-740.

**Su J, Wang Y, Si Y, Gao J, Song C, Cui L, Wu R, Tai G und Zhou Y (2018)** Galectin-13, a different prototype galectin, does not bind  $\beta$ -galactosides and forms dimers via intermolecular disulfide bridges between Cys-136 and Cys-138. Scientific Reports 8, Artikelnummer 980.

**Sun ZK, Yang HQ und Chen SD (2013)** Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease. Trans Neurodegener 2(1), Artikelnummer: 6

**Sweet DP, Shapiro RH und Albersheim P (1975)** Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. Carbohydrate Research 40(2), S. 217–225.

**Tao Z, Jin W, Ao M, Zhai S, Xu H und Yu L (2019)** Evaluation of the anti-inflammatory properties of the active constituents in *Ginkgo biloba* for the treatment of pulmonary diseases. Food and Function. 10, Artikelnummer: 2209.

**Tan L, Eberhard S, Pattathill S, Warder C, Glushka J, Yuan C, Hao Z, Zhu X, Avci U, Miller JS, Baldwin D, Pham C, Orlando R, Darvill A, Hahn MG, Kieliszewski MJ und Mohnen D (2013)** An Arabidopsis Cell Wall Proteoglycan Consists of Pectin and Arabinoxylan Covalently Linked to an Arabinogalactan Protein. The Plant Cell 25, S. 270-287.

**Tan L, Showalter AM, Egelund J, Hernandez-Sanchez A, Doblin MS und Bacic A (2012)** Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Frontiers in Plant Science* 3, Artikelnummer149.

**Tang XC, He YQ, Wang Y und Sun MX (2006)** The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Journal of Experimental Botany* 57(11), S. 2639-2650.

**Taylor RL und Conrad HE (1972)** Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl group. *Biochemistry* 11(8), S. 1383–1388.

**Torode TA, O'Neill R, Marcus SE, Cornuault V, Pose S, Lauder RP, Kračun SK, Rydahl MG, Andersen MCF, Willats WGT, Braybrook SA, Townsend BJ, Clausen MH und Knox JP (2018)** Branched Pectic Galactan in Phloem-Sieve-Element Cell Walls: Implications for Cell Mechanics. *Plant Physiology* 176, S. 1547–1558.

**Thude S (2005)** Strukturelle und immunpharmakologische Untersuchungen zu Arabinogalactan-Proteinen und einem Arabinan aus *Echinacea purpurea*. Dissertation.

**Thude S und Classen B (2005)** High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan. *Phytochemistry* 66, S. 1026-1032.

**Thude S, Classen B, Blaschek W, Barz D und Thude H (2006)** Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes. *Phytomedicine* 13(6), S. 425–427.

**Ude C, Schubert-Zsilavecz M und Wurglics M (2013)** *Ginkgo biloba* Extracts: A Review of the Pharmacokinetics of the Active Ingredients. *Clinical Pharmacokinetics* 52, S. 727-749.

**Unverdorben L, Haufe T, Santoso L, Hofmann S, Jeschke U und Hutter S (2016)** Prototype and Chimera-Type Galectins in Placentas with Spontaneous and Recurrent Miscarriages. *International Journal of Molecular Sciences* 17(5), Artikelnummer: 644.

**Usov AI, Bilan MI und Shashkov AS (1997)** Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydrate Research* 303(1), S. 93–102.

- Van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T, Harms G, van Goor H, Zwiers P, van Wegghele R, Poppema S und Visser L (2004)** Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *Journal of Pathology* 204, S. 511-518.
- Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Verhoef R, Schols HA, McCleary BV, McKee L, Gilbert HJ und Knox JP (2009)** Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. *Plant Journal* 59, S. 413–425.
- Volk RB, Blaschek W, Classen B (2007)** Characterization of an arabinogalactan protein from the pressed juice of *Echinacea purpurea*: Investigations into the type of linkage between the protein and polysaccharide moieties. *Journal of Natural Medicines* 61(4), S. 397–401.
- Wang XQ und Ran JH (2014)** Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75, S. 24-40.
- Wang W, Wan T, Becher H, Kuderova A, Leitch IJ, Garcia S, Leitch AR und Kovarik A (2019)** Remarkable variation of ribosomal DNA organization and copy number in gymnosperms, a distinct lineage of gymnosperms. *Annals of Botany* 123, S. 767-781.
- Willats WGT, Marcus SE und Knox JP (1998)** Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- $\alpha$ -L-arabinan. *Carbohydrate Research* 308, S. 149-152.
- Willson JL, Scott IM und McMurry L (2010)** Optical Biosensing. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 38(6), S. 400-407.
- Wu Y, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, Link CD und Luo Y (2006)** Amyloid--Induced Pathological Behaviors Are Suppressed by *Ginkgo biloba* Extract EGb 761 and Ginkgolides in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience* 26(50), S. 13102-13113.
- Xiao Q, Ludwig AK, Romano C, Buzzacchera I, Sherman SE, Vetro M, Vertesy S, Kaltner H, Reed EH, Möller M, Wilson CJ, Hammer Da, Oscarson S, Klein ML, Gabius HJ und Percec V (2018)** Exploring functional pairing between surface glycoconjugates and human galectins using programmable glycodendrimersomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(11), S. E2509-E2518.
- Yariv J, Lis H und Katchalski E (1967)** Precipitation of Arabic Acid and some Seed Polysaccharides by Glycosylphenylazo Dyes. *Biochemical Journal* 105, Artikelnummer 1c.

- Yariv J, Rapport M und Graf L (1962)** The Interaction of Glycosides and Saccharides with Antibody to the Corresponding Phenylazo Glycosides. *Biochemical Journal* 85, S. 383–388.
- Yamada S, Ohkubo S, Miyashita H und Setoguchi H (2012)** Genetic diversity of symbiotic cyanobacteria in *Cycas revoluta* (Cycadaceae). *FEMS Microbiology Ecology* 81, S. 696-706.
- Yang RY und Liu FT (2003)** Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Science* 60, S. 267-276.
- Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W und Knox JP (1996)** Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6(2), S. 131-139.
- Yatomi R, Nakamaru S und Nakamaru N (2002)** Immunichemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of gymnosperms. *Grana* 41, S. 21-28.
- Yessoufou K, Bamigboye SO, Daru BH und van der Bank M (2013)** Evidence of constant diversification punctuated by a mass extinction in the African cycads. *Ecology and Evolution* 4(1), S. 50-58.
- Yin Y, Chen H, Hahn MG, Mohnen D und Xu Y (2010)** Evolution and Function of the Plant Cell Wall Synthesis-Related Glycosyltransferase Family. *Plant Physiology* 153, S. 1729-1746.
- Yoo HD, Kim D, Paek SH und Oh SE (2012)** Plant Cell Wall Polysaccharides as Potential Resources for the Development of Novel Prebiotics. *Biomolecules & Therapeutics* 20(4), S. 371-379.
- Yoshino TP, Dinguirard N, Kunert J und Hokke CH (2008)** Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Gene* 411(1-2), S. 46-58.
- Youl JJ, Bacic A und Oxley D (1998)** Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, S. 7921-7926.
- Zandleven J, Beldmann G, Bosveld M, Benen J und Voragen A (2005)** Mode of action of xylogalacturonan hydrolase towards xylogalacturonan and xylogalacturonan oligosaccharides. *Biochemical Journal* 387, S. 719-725.

**Zhang T, Miller MC, Zheng Y, Zhang Z, Xue H, Zhao D, Su J, Mayo KH, Zhou Y und Tai G (2017)** Macromolecular assemblies of complex polysaccharides with galectin-3 and their synergistic effects on function. *Biochemical Journal* 474, S. 3849-3868.

**Zhang T, Zheng Y, Zhao D, Yan J, Sun C und Zhou Y (2016)** Multiple approaches to assess pectin binding galectin 3. *International Journal of Biological Macromolecules* 91, S. 994-1001.

**Zhong R und Ye ZH (2015)** Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. *Plant Cell Physiology* 56(2), S. 195-214.

**Zuo W, Yan F, Zhang B, Li J und Mei D (2017)** Advances in the Studies of *Ginkgo Biloba* Leaves Extract on Aging-Related Diseases. *Aging and Disease* 8(6), S. 812-826.



## 8. ANHANG

### 8.1. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter **Prof. Dr. Birgit Classen**, die es mir ermöglichte, als Doktorand an diesem interessanten Forschungsthema zu arbeiten. Ich danke Ihr für Ihre Unterstützung, Ihr Wissen, Ihr Vertrauen und dafür, dass Sie mir jederzeit ein flexibles Arbeiten ermöglicht hat. Ihre herzliche und verständnisvolle Art ermöglichte das Schaffen einer einzigartigen Arbeitsatmosphäre, die so viele tolle Momente geschaffen hat.

Ich danke insbesondere meinen Arbeitskollegen **Jon** und **Lukas**, den Masterstudenten **Ole**, **Katrin** und **Lina** für das entstandene freundschaftliche Verhältnis und dafür, dass immer eine so tolle Stimmung im Arbeitskreis herrschte. Dank Euch ging man aus jeder noch so schweren Situation immer mit einem Lachen und Ihr habt mit Eurer unvergesslichen Art so viele Erinnerungen gestaltet. Danke!

Weiterhin danke ich **Johanna** für die schönen Gespräche und die gemeinsame Zeit sowie **Steffen** für die Entstehung einer Freundschaft.

**Thomas** danke ich für die vielen interessanten und unterhaltsamen Gespräche während dieser Zeit.

Herrn **Prof. Dr. Eric Beitz** sowie **Lea** und **Basti** danke ich für die interessante und umfangreiche Kooperationsarbeit im Rahmen der zellfreien Proteinsynthese.

Weiterhin möchte ich **Caroline**, **Torben**, **Josephine**, **Siggi** und **Rainer** und meinen Freunden danken, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, immer für mich da waren und nie den Glauben an mich verloren haben. Ohne Euch hätte ich das Pensum dieser Arbeit nicht geschafft.

## **8.2. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst habe und keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Die Dissertation wurde weder in identischer noch in einer ähnlichen Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, ist nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht worden. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Außerdem versichere ich, dass mir noch nie ein akademischer Grad aberkannt wurde.

Kiel, 2020

Alexander Baumann